



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**O EFEITO DE TRÊS AGENTES INDUTORES DE REMINERALIZAÇÃO SOBRE LESÕES
DE CÁRIE SIMULADAS ARTIFICIALMENTE NA SUPERFÍCIE DO ESMALTE - ESTUDO
IN VITRO**

Trabalho submetido por
Paula Catarina Aparício De Assunção
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**O EFEITO DE TRÊS AGENTES INDUTORES DE
REMINERALIZAÇÃO SOBRE LESÕES DE CÁRIE
SIMULADAS ARTIFICIALMENTE NA SUPERFÍCIE DO
ESMALTE – ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por
Paula Catarina Aparício De Assunção
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Manso
e coorientado por
Prof. Doutora Carla Ascenso

outubro de 2015

Aos meus pais,
Que sempre me apoiaram,
E tornaram este sonho possível.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Ana Cristina Manso, por todo o apoio prestado, incentivo e rigor, e por se ter demonstrado sempre disponível para qualquer esclarecimento.

À Prof. Doutora Carla Ascenso, pela sua coorientação, disponibilidade e boa disposição demonstradas ao longo deste trabalho.

À Doutora Isabel Nogueira pela sua disponibilidade e contributo na elaboração deste projeto.

À Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, pelos materiais disponibilizados e pela excelente formação que proporciona aos seus alunos, tanto a nível profissional, como a nível pessoal.

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e confiança demonstrados ao longo de todo o meu percurso académico e, principalmente, durante a elaboração deste projeto. Sei que, sem eles, a concretização deste sonho não teria sido possível. O meu profundo agradecimento pela excelente e inesquecível experiência que me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Miguel e Francisca, e à Carla pelo incentivo e apoio demonstrados.

Às minhas avós, pela preocupação, incentivo e orgulho transmitidos.

Ao Hugo Domingos, Bernardo Bettencourt Lucas e Patricia Branco, pela paciência, amizade e motivação. Sem eles, tudo teria sido mais difícil e solitário. Obrigada pela presença assídua, a qualquer hora, e por todas as experiências inesquecíveis que partilhamos nestes últimos anos.

À Ana Sofia Santos, Ana Rita Dias, Sofia Soares e Dário Pereira, pela longa e inigualável amizade, pelas experiências e aprendizagens partilhadas.

A todos o meu profundo agradecimento.

RESUMO

Objetivos: Comparar a microdureza de superfície do esmalte humano quando se utilizam: o gel de CPP-ACP, o verniz de fosfato de cálcio (< 5%) e o verniz fluoreto de sódio a 5%, após a indução artificial de cárie dentária. Analisar microscopicamente o efeito que estes agentes têm sobre o esmalte humano, após a indução artificial de cárie dentária.

Materiais e métodos: 28 espécimes, obtidos a partir de 16 molares humanos, foram submetidos a uma solução tampão de ácido láctico a pH 5 para indução artificial de lesões de *white spot*. Posteriormente, foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos de estudo, nos quais foram aplicados: um gel de CPP-ACP, um verniz de fosfato de cálcio (<5%) e um verniz de fluoreto de sódio (5%). Inicialmente foram analisados os espécimes que apenas sofreram indução artificial de lesões de *white spot*; de seguida foram analisados os espécimes após o tratamento com cada um dos agentes remineralizantes e, finalmente, foram analisados os restantes espécimes após um ciclo de desmineralização com ácido láctico e remineralização com saliva artificial. A superfície de cada espécime foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento (MEV) e pelo teste de microdureza de Vickers.

Resultados: Observou-se um aumento mais acentuado da microdureza de superfície no esmalte tratado com CPP-ACP. No entanto, pôde observar-se uma maior homogeneidade nos prismas de esmalte e maior preenchimento de lacunas nos espécimes tratados com os vernizes de fosfato de cálcio e fluoreto de sódio.

Conclusões: O gel de CPP-ACP expressa uma tendência ao aumento da microdureza de superfície do esmalte humano, comparativamente aos sistemas de verniz de flúor de alta concentração. No entanto, os vernizes de flúor de alta concentração tendencialmente modificam a qualidade da superfície do esmalte humano, após a indução artificial de cárie dentária.

Palavras-chave: White Spot, CPP-ACP, fosfato de cálcio, fluoreto de sódio.

ABSTRACT

Objectives: To compare the surface hardness of human enamel when used: CPP-ACP gel, the calcium phosphate varnish (<5%) and sodium fluoride varnish at 5% after the artificial induction of dental caries. Examine microscopically the effect that these agents have on the human enamel after induction of dental caries.

Materials and methods: 28 specimens obtained from 16 human molars were subjected to a lactic acid buffer solution at pH 5 for artificial induction of *white spot* lesions. Afterwards, they were randomly divided into different study groups, in which they were applied: a CPP-ACP gel, a calcium phosphate varnish (<5%) and a sodium fluoride varnish (5%). Initially, only the specimens having undergone artificial induction of *white spot* lesions were analyzed; then the specimens were analyzed after treatment with each of the remineralizing agents, and finally the remaining specimens were analyzed after one cycle of demineralization with lactic acid and remineralization with artificial saliva. The surface of each specimen was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and by the Vickers microhardness test.

Results: There was a greater increase in the surface hardness of the enamel treated with CPP-ACP. However, it could be observed a higher homogeneity in enamel prisms and better filling of gaps in the specimens treated with calcium phosphate and sodium fluoride varnishes.

Conclusions: The CPP-ACP gel expresses a trend towards the increase of human enamel surface microhardness, when compared to the high concentration fluoride varnish systems. However, the high concentration of fluoride varnish tends to modify the surface quality of human enamel, after artificial induction of dental caries.

Keywords: White spot, CPP-ACP, calcium phosphate, sodium fluoride

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
ÍNDICE GERAL	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	16
I - INTRODUÇÃO	17
II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
1. Considerações éticas.....	23
2. Local do estudo	23
3. Desenho do estudo:	23
4. Seleção da amostra e preparação dos espécimes	25
5. Indução da desmineralização simulando lesões artificiais de <i>white spot</i> (Fase 1)	28
6. Aleatorização da amostra e aplicação dos Agentes Indutores de Remineralização	30
7. Ciclo de Fase Conjunta (Fase 2):	34
8. Teste de Microdureza de Vickers.....	35
8. Tratamento das amostras para Observação ao Microscópio Eletrónico de Varrimento.....	37
III - RESULTADOS.....	39
1. Resumo dos valores obtidos na análise de microdureza de Vickers em cada fase do estudo.....	58
2. Resumo das imagens obtidas em MEV em cada fase do estudo:	58
IV - DISCUSSÃO	61
V - CONCLUSÃO	65
VI - BIBLIOGRAFIA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do procedimento experimental	24
Figura 2. Cortadora Struers Accutom-50 pertencente ao laboratório de biomateriais do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.	26
Figura 3. Exemplo de como foi efetuado o corte das raízes dos molares humanos.	26
Figura 4. Espécimenes obtidos a partir do corte ocluso-cervical das coroas de molares humanos, exemplificativos da hemi-seção de um dente.	27
Figura 5. Espécimenes exemplificativos da aplicação da fita adesiva e do verniz de unhas.	27
Figura 6. Espécimenes exemplificativos da retirada da fita adesiva, prontos para a indução de lesões artificiais de white spot.	28
Figura 7. Preparação da solução tampão de ácido láctico usado, na indução de lesões artificiais de white spot.	29
Figura 8. Gel de CPP-ACP (GC Tooth Mousse, Recaldent).	31
Figura 9. Verniz de fosfato de cálcio (Clinpro™ White Varnish, 3M ESPE).	32
Figura 10. Verniz de fluoreto de sódio (Profluorid® Varnish, VOCO).	33
Figura 11. Imagem exemplificativa da imersão dos espécimenes constituintes de um grupo num gobelet contendo saliva artificial.	34
Figura 12. Máquina HSV-30® (Shimadzu) usada nos testes de Microdureza de Vickers.	36
Figura 13. Análise da microdureza de superfície de um espécime pela técnica de Vickers.	36
Figura 14. Imagem observada durante o teste de microdureza de superfície de Vickers.	37
Figura 15. Microscópio Eletrónico de Varrimento (JEOL JSM-700001F) do Instituto Superior Técnico.	38
Figura 16. Imagem exemplificativa de visão panorâmica sobre a superfície do Esmalte a x1000, após indução de Lesões Artificiais de <i>white spot</i> – controlo inicial.	40
Figura 17. Imagem exemplificativa de visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de Lesões Artificiais de <i>white spot</i> – controlo inicial. Observa-se desorganização estrutural do esmalte, tanto dos prismas como de substância interprismática, com distintas orientações.	40

- Figura 18.** Imagem exemplificativa de visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesões artificiais de *white spot* – controlo inicial. A desorganização dos cristais é mais evidente, assumindo planos de destruição heterogéneos e com aspecto lacunar.41
- Figura 19.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot* e imersão em água desionizada (grupo controlo positivo). Observam-se fracturas de esmalte por tensão e orientação dos prismas.42
- Figura 20.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot* e imersão em água desionizada (grupo controlo). Observa-se desorganização da substância prismática e interprismática, mantendo um aspecto de distintos planos lacunares.42
- Figura 21.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot* e imersão em água desionizada (grupo controlo). Observa-se desorganização de cristais e sua fractura, por camadas, assumindo as mesmas distinta orientação e aspecto lacunar.43
- Figura 22.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com gel de CPP-ACP. Observam-se zonas de desmineralização dos prismas, assumindo a mesmo um aspeto de “favo de mel”, e zonas recobertas com CPP-ACP, com deposição de fosfato e cálcio sobre a sua superfície.44
- Figura 23.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com gel de CPP-ACP, observam-se zonas de heterogéneas de desorganização de prismas de esmalte, e na ampliação dos “favos de mel”, observamos depósitos compatíveis, com hiper-mineralização por CPP-ACP.44
- Figura 24.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com gel de CPP-ACP. Observam-se, distintas zonas, heterogéneas, mas agregadas entre si, sugestivas de deposição mineral compatível com CPP-ACP.45
- Figura 25.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com Verniz de Fosfato De cálcio.46
- Figura 26.** Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com Verniz de Fosfato De cálcio.

Observam-se zonas homogêneas sobre os prismas de esmalte e com aglomeração mineral na sua superfície compatível com a aplicação de fosfato de cálcio.	46
Figura 27. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> e tratamento com Verniz de fosfato de cálcio. Observam-se zonas homogêneas sobre os prismas de esmalte e com aglomeração mineral na sua superfície compatível com a aplicação de fosfato de cálcio, com evidente preenchimento de espaços lacunares.....	47
Figura 28. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> e tratamento com Verniz de fluoreto de sódio.....	48
Figura 29. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> e tratamento com verniz de fluoreto de sódio. Observam-se zonas heterogêneas de hiper-remineralização compatíveis com a aplicação de fluoreto de sódio e depósito de substância interprismática.....	48
Figura 30. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> e tratamento com verniz de fluoreto de sódio. Constatam-se zonas de maior homogeneidade, e deposição mineral, compatíveis com a aplicação de fluoreto de sódio.	49
Figura 31. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com água desionizada e CFC, onde é notória a orientação dos prismas.	50
Figura 32. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com água desionizada e CFC, com zonas de desmineralização e reorganização mineral.	51
Figura 33. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com água desionizada e CFC, com zonas de desmineralização e reorganização mineral.	51
Figura 34. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um gel de CPP-ACP e CFC, onde se observa uma zona de desorganização e fractura de prismas de esmalte, sem substância interprismática em diferentes planos e com depleção de fosfato de cálcio.	52
Figura 35. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um gel de CPP-ACP e CFC,	

evidenciando a destruição da sua estrutura cristalina, com várias lacunas no complexo da hidroxiapatite.....	53
Figura 36. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um gel de CPP-ACP e CFC, evidenciando a destruição da sua estrutura cristalina, com várias lacunas, mais profundas, no complexo da hidroxiapatite e depleção de fosfato de cálcio.	53
Figura 37. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um verniz de Fosfato De cálcio e CFC, onde se observa precipitado de fluoreto e fosfato de cálcio.	54
Figura 38. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um verniz de Fosfato De cálcio e CFC, onde se observam várias zonas de precipitado de fluoreto e fosfato de cálcio.	55
Figura 39. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um verniz de Fosfato De cálcio e CFC, onde se observam várias zonas de precipitado de fluoreto e fosfato de cálcio, e reorganização desta camada superficial.....	55
Figura 40. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um verniz de Fluoreto de Sódio e CFC.....	56
Figura 41. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um verniz de Fluoreto de Sódio e CFC, zonas homogêneas, compatíveis com remineralização, formando fluoreto de cálcio.	57
Figura 42. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de <i>white spot</i> , tratamento com um verniz de Fluoreto de Sódio e CFC, onde se observam várias zonas de precipitado de fluoreto de cálcio e reorganização desta camada superficial.	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores obtidos na medição do pH dos agentes remineralizantes utilizados.....	39
Tabela 2. Valores de Microdureza de Vickers obtidos na fase 1, após a indução de LAWS.	39
Tabela 3. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo A, 6h após a aplicação de água desionizada (grupo controlo positivo).....	41
Tabela 4. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo B, 6h após a aplicação do agente remineralizante – gel de CPP-ACP.	43
Tabela 5. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo C, 6h após a aplicação do agente remineralizante – verniz de fosfato de cálcio.	45
Tabela 6. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo D, 6h após a aplicação do agente remineralizante – verniz de fluoreto de sódio.....	47
Tabela 7. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo A, após a aplicação do AR – água desionizada (grupo controlo) e o CFC.	50
Tabela 8. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo B, após a aplicação do agente remineralizante – gel de CPP-ACP e o CFC.	52
Tabela 9. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo C, após a aplicação do AR – verniz de fosfato de cálcio e CFC.....	54
Tabela 10. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo D, após a aplicação do AR – verniz de fluoreto de sódio e CFC.....	56
Tabela 11. Tabela comparativa dos resultados de microdureza de superfície obtidos em cada grupo e em cada fase do estudo.	58
Tabela 12. Imagens obtidas após indução de LAWS (Fase 1) (x1000; x10000; x30000)	58

Tabela 13. Imagens obtidas após indução de LAWS, aleatorização dos grupos e tratamento com um agente remineralizante.	59
Tabela 14. Imagens obtidas após indução de LAWS, tratamento com um agente remineralizante e CFC	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFM	Microscopia de força atômica (<u>A</u> tom <u>i</u> c <u>F</u> orce <u>M</u> icroscopy)
AR	<u>A</u> gente <u>r</u> emineralizante
CPP-ACP	Casein Phosphopeptide - Amorphous Calcium Phosphate
CPP-ACFP	Casein Phosphopeptide - Amorphous Calcium Fluoride Phosphate
CFC	<u>C</u> iclo de <u>f</u> ase <u>c</u> onjunta
HV	Vickers Hardness
LAWS	Lesões Artificiais de <u>w</u> hite <u>s</u> pot
MEV	<u>M</u> icroscópio <u>e</u> letrónico de <u>y</u> arrimento
MPa	Mega Pascal
UTL	Universidade Técnica de Lisboa

I - INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial. O seu aparecimento está relacionado com vários fatores tais como (a) a produção de ácido pelas bactérias cariogénicas, que degradam os açúcares e hidratos de carbono ingeridos, (b) a suscetibilidade da superfície dentária, (c) e a qualidade e quantidade de saliva produzida (Cummins, 2013; G. M. S. Oliveira et al., 2014), entre outros. Estes ácidos, resultantes da fermentação dos hidratos de carbono, podem despoletar alterações no biofilme, levando à formação de uma placa bacteriana cariogénica. O tempo é também um fator determinante na gravidade da doença, assim como os fatores comportamentais, a educação e o *status* socioeconómico (Fejerskov, 2004; Costa et al., 2012; Cummins, 2013). Esta é uma doença de elevada prevalência, apresentando-se como um problema maior de saúde pública (Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N., Burrow, M.F., & Reynolds, E.C., 2010; Li et al., 2014). O número elevado de pacientes portadores de cárie crónica deve-se, em parte, à introdução de açúcares na dieta, típica dos países industrializados, associada a uma higiene oral deficiente e/ou pouco frequente. A cárie dentária pode levar ao aparecimento de dor, havendo uma diminuição da qualidade de vida dos indivíduos, malnutrição e outros problemas de saúde. Pode ainda ter consequências a nível estético, levando a distúrbios emocionais, de autoconfiança e autoestima (Cummins, 2013).

Inicialmente, as lesões de cárie apresentam-se como sub-superficiais, sendo apenas zonas desmineralizadas por baixo de esmalte superficial intacto, conhecidas como *white spot* (Arends & Christoffersen, 1986; Cummins, 2013). Esta desmineralização pode ser revertida, uma vez que, quando o ácido é removido da superfície dentária, inicia-se a remineralização. Quando a saliva está saturada de iões cálcio e fosfato, estes são transportados para o dente desmineralizado havendo reparação da estrutura de hidroxiapatite (Cummins, 2013). Os sinais de um processo cariogénico podem variar desde uma primeira alteração molecular nos cristais de apatite, passando por uma visível lesão de *white spot*, até uma eventual cavitação, envolvendo a dentina. Esta progressão resulta de um processo de desequilíbrio entre fatores patológicos e protetores, levando à dissolução dos cristais de hidroxiapatite por perda de cálcio, fosfato e outros iões da superfície dentária (Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N., Burrow, M.F., & Reynolds, E.C., 2010).

As bactérias acidogénicas mais comumente responsáveis pela cárie dentária denominam-se *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.* Estas últimas, assim

denominadas por converterem lactose e outros hidratos de carbono em ácido láctico, são sensíveis a baixos níveis de pH e apenas sobrevivem no meio ácido por elas gerado, devido ao desenvolvimento de um mecanismo de tolerância ao ácido por elas viabilizado (Bowen, 2002; Cummins, 2013). O *Streptococcus mutans* é uma das espécies com maior prevalência no biofilme da cavidade oral e metaboliza hidratos de carbono fermentáveis para produzir ácido láctico (Do et al., 2013). Após a ingestão de açúcares, o pH intraoral pode atingir valores inferiores a 4.0, aos quais as bactérias não sobreviveriam. No entanto, através de uma bomba de prótons, estes microrganismos conseguem manter um pH intracelular 0,5-1 valores acima do pH extracelular, o que lhes permite a sobrevivência. O pH ótimo para a atuação da ATPase é de 5.0 no *L. casei* e 6.0 no *S. mutans* (Bowen, 2002). Para além destas bactérias mais comuns, existem também outras associadas à saúde oral e que estão presentes no biofilme. Porém, estas últimas não apresentam vias de resistência ao ácido, mas sim um mecanismo alternativo mediado por uma arginina desaminase, um enzima que catalisa a quebra das ligações das argininas presentes na saliva, produzindo amónia. Por ser uma base, a amónia neutraliza o ácido presente na placa bacteriana, aumentando o seu pH, e permitindo assim a sobrevivência das bactérias que protegem o biofilme e impedem a sua alteração de saudável para placa bacteriana cariogénica (Cummins, 2013).

Quando o ácido láctico, produzido pelas bactérias, se encontra em quantidade e frequência suficientes, os níveis de pH local descem, ficando este abaixo do nível de pH crítico, referido anteriormente (Cummins, 2013). Este fenómeno faz com que abaixo do pH crítico, exista dissolução dos cristais de hidroxiapatite, tendo o mesmo sido definido como 5,5 para este mineral (Larsen & Pearce, 2003). Assim, a interface dente-biofilme sofre uma sub-saturação de iões cálcio e fosfato, levando à dissolução destes iões, presentes no esmalte, e à sua desmineralização. Na presença de flúor, o pH crítico de dissolução é mais baixo, ou seja, é necessário um pH mais baixo para que ocorra a dissolução de minerais da superfície dentária (Bowen, 2002; Cummins, 2013; Rošin-Grget, Peroš, Sutej, & Bašić, 2013). Isto deve-se ao facto de, na presença de flúor, o ião OH⁻ da hidroxiapatite [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] ser substituído por um ião fluoreto (F⁻), levando assim à formação de fluorapatite [Ca₁₀(PO₄)₆F₂] cujo pH crítico é de 4,5 (Rošin-Grget et al., 2013; Mony, Rao, Shenoy, & Suprabha Srikrishna, 2015).

Quando o pH intraoral se encontra abaixo do pH crítico, inicia-se a desmineralização, podendo levar ao aparecimento de lesões de *white spot*. Estas alterações morfológicas e visuais do esmalte são a primeira forma de apresentação de

cárie dentária e são lesões visíveis clinicamente que, em fase ativa, apresentam uma elevada opacidade, uma cor esbranquiçada e sem brilho. Histologicamente, observa-se uma superfície totalmente mineralizada sob a qual existe uma zona de desmineralização. Dependendo da extensão da lesão, esta pode ser observada com a superfície do esmalte seca ou húmida (G. Oliveira, 2009).

Após a introdução do ião fluoreto, a incidência, prevalência e severidade de cárie dentária sofreu uma diminuição significativa em muitos dos países desenvolvidos. (Li et al., 2014)(Li et al., 2014)Na última década, a investigação desenvolveu-se no sentido da deteção precoce de lesões de cárie e do tratamento não invasivo das mesmas, através da sua remineralização, preservando assim a estrutura dentária (Li et al., 2014), a estética, a resistência e a função (Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N., Burrow, M.F., & Reynolds, E.C., 2010; Meneses da Silva et al., 2012). O flúor, apesar de reconhecido como agente remineralizante (Griffin, Regnier, Griffin, & Huntley, 2007), tem a sua ação dependente da presença de iões cálcio e fosfato. (Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N., Burrow, M.F., & Reynolds, E.C., 2010). Estes encontram-se em supersaturação na saliva humana (G. M. S. Oliveira et al., 2014) sempre que houver dissolução do esmalte, resultante de um meio ácido, que promova a quebra das ligações entre os constituintes da hidroxiapatite, deixando-os em suspensão. O flúor tem a capacidade de precipitar sob a forma de fluoreto de cálcio e fluorapatite, conferindo à dentina e ao esmalte uma maior resistência à dissolução pelos ácidos (Epasinghe, Yiu, & Burrow, 2014). Assim, novos agentes têm sido introduzidos no mercado e criados novos produtos, de forma a aumentar a capacidade de remineralização do flúor sobre a superfície dentária (Cummins, 2013; Li et al., 2014). No entanto, durante a formação dentária, uma elevada exposição sistémica ao flúor pode causar fluorose dentária decorrente do uso de várias fontes de flúor, sendo esta a principal limitação da administração deste composto e que terá levado à procura que novos produtos, com menos efeitos colaterais e tão ou mais eficazes (G. Oliveira, 2009).

A caseína é uma fosfoproteína presente no leite bovino. A caseína fosfopeptídea (Casein Phosphopeptide - CPP) é obtida a partir da caseína, é insípida (Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N., Burrow, M.F., & Reynolds, E.C., 2010), tem baixa antigenicidade (Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N., Burrow, M.F., & Reynolds, E.C., 2010; Li et al., 2014) e pode ser purificada em nano-complexos de CPP-ACP (Casein Phosphopeptide - Amorphous Calcium Phosphate) por precipitação seletiva, permuta de iões ou ultrafiltração (Rose, 2000; Li et al., 2014). O seu efeito remineralizante tem sido

amplamente estudado *in vitro*. Estudos demonstraram que o CPP tem capacidade de estabilizar, não só, iões de cálcio e fosfato (Cao et al., 2013; Li et al., 2014; G. M. S. Oliveira et al., 2014), livres e em suspensão na saliva, mas também nanocomplexos de ACP (Cao et al., 2013; Li et al., 2014), mantendo estes compostos em supersaturação na cavidade oral (G. M. S. Oliveira et al., 2014). Foi ainda demonstrado que o CPP-ACP tem uma boa adesão à placa bacteriana (Li et al., 2014). Este atua simultaneamente como reservatório e como tampão na saliva de iões cálcio e fosfato livres, originando uma supersaturação destes compostos na placa bacteriana e favorecendo a remineralização dentária (Li et al., 2014; G. M. S. Oliveira et al., 2014; Shetty, Hegde, & Bopanna, 2014).

O CPP-ACP promove a remineralização da dentina e, em particular, das lesões iniciais superficiais e sub-superficiais do esmalte, nomeadamente as *white spot*, tendo este um efeito remineralizante e anticariogénico (Cochrane, N.J., Cai, F., Huq, N., Burrow, M.F., & Reynolds, E.C., 2010; Cao et al., 2013; Li et al., 2014). O seu efeito remineralizante pode ainda ser potenciado, se usado em simultâneo com pastas de dentes fluoretadas, havendo assim, uma maior deposição de minerais (Shetty et al., 2014).

Os vernizes fluoretados para aplicação na superfície dentária são a forma mais usada de aplicação tópica de flúor no controlo da cárie, devido à sua adesão à superfície dentária, que permite uma prolongada manutenção dos níveis de flúor na cavidade oral (Cardoso et al., 2014). A aplicação, em consultório, deste tipo de vernizes é aconselhada a todos os indivíduos que apresentem uma suscetibilidade moderada a severa para a cárie dentária (Delbem, Bergamaschi, Sassaki, & Cunha, 2006; Magalhães, Comar, Rios, Delbem, & Buzalaf, 2008), e é a forma mais conveniente de aplicação profissional em crianças com risco acrescido de cárie, por ser fácil de aplicar, bem tolerada e não requerer cooperação por parte dos pacientes (Carvalho, D.M., Salazar, M., Silva, E., & Coutinho, F., 2010; Meneses da Silva et al., 2012).

Os vernizes de fluoreto de sódio foram reportados como sendo os mais eficazes como agentes anticariogénicos (Cardoso et al., 2014) e são a forma mais comum de aplicação de flúor (Magalhães et al., 2008). Em alguns países, a aplicação em consultório deste verniz é aconselhado a crianças entre os 0 e os 3 anos, como forma de prevenção da cárie, devido ao seu efeito cariostático e fácil aplicação (Delbem et al., 2006).

Na tentativa de melhorar a capacidade remineralizante dos vernizes de fluoreto de sódio, foi-lhes adicionado fosfato de cálcio. Alguns estudos demonstraram que a “Clinpro”, (fluoreto de sódio 950 – ppm de flúor) que contém fosfato beta-tricálcico, é eficaz na redução das lesões de *white spot*. O fosfato de cálcio é adicionado em conjunto com o lauril sulfato de sódio. Este processo permite que não haja interação precoce entre o cálcio e o flúor, o que poderia levar à inativação de ambos os compostos. O fosfato de cálcio estabiliza o flúor e mantém-no numa alta concentração de fosfato de cálcio e flúor nas lesões de *white spot* (Jo et al., 2014).

Uma vez que a cárie dentária é ainda um grave problema de saúde oral, e sendo a sua remineralização uma opção a considerar, com o presente trabalho pretendia-se:

- Comparar a micro dureza de superfície do esmalte humano após remineralização com CPP-ACP, verniz de fosfato de cálcio (< 5%) e verniz fluoreto de sódio a 5%, após a indução artificial de cárie dentária;
- Medir o pH do CPP-ACP, do verniz de fosfato de cálcio (< 5%) e do verniz fluoreto de sódio a 5%;
- Analisar microscopicamente o efeito que o CPP-ACP tem sobre esmalte humano, após a indução artificial de cárie dentária;
- Analisar microscopicamente o efeito que o verniz de fosfato de cálcio (< 5%) tem sobre esmalte humano, após a indução artificial de cárie dentária;
- Analisar microscopicamente o efeito que o verniz fluoreto de sódio a 5% tem sobre esmalte humano, após a indução artificial de cárie dentária;

Para tal, foram equacionadas as seguintes hipóteses:

- Existem alterações qualitativas na superfície do esmalte humano, quando se empregam vernizes de flúor de alta concentração, após a indução artificial de cárie dentária, quando comparadas com a superfície de esmalte humano, remineralizado com o sistema CPP-ACP;
- Não existe diferença na microdureza do esmalte humano, quando se utilizam vernizes de flúor de alta concentração, após a indução artificial de cárie dentária;

- Existe diferença na microdureza de superfície do esmalte humano quando se comparam sistemas de verniz de flúor de alta concentração com sistemas de CPP-ACP;

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de investigação foi submetido à Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, tendo sido aprovado. Os dentes do estudo foram fornecidos pelo banco de dentes da Clínica Dentária Egas Moniz, tendo sido obtidos de sujeitos preservando o anonimato e preservados até 6 meses após a sua extração, numa solução diluída de cloramina T a 0,5% e água desionizada a 4°C, até serem usados.

2. LOCAL DO ESTUDO

O estudo decorreu no Laboratório de Biomateriais e no Laboratório de Morfologia do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. A parte da Microscopia Electrónica de Varrimento foi efetuada no Laboratório de Microscopia Eletrónica no Instituto Superior Técnico, da UTL. O estudo foi efetuado entre Junho e Julho de 2015.

3. DESENHO DO ESTUDO:

Foi executado um estudo experimental *in vitro*, analítico e prospetivo, o qual se encontra esquematizado na figura 1.

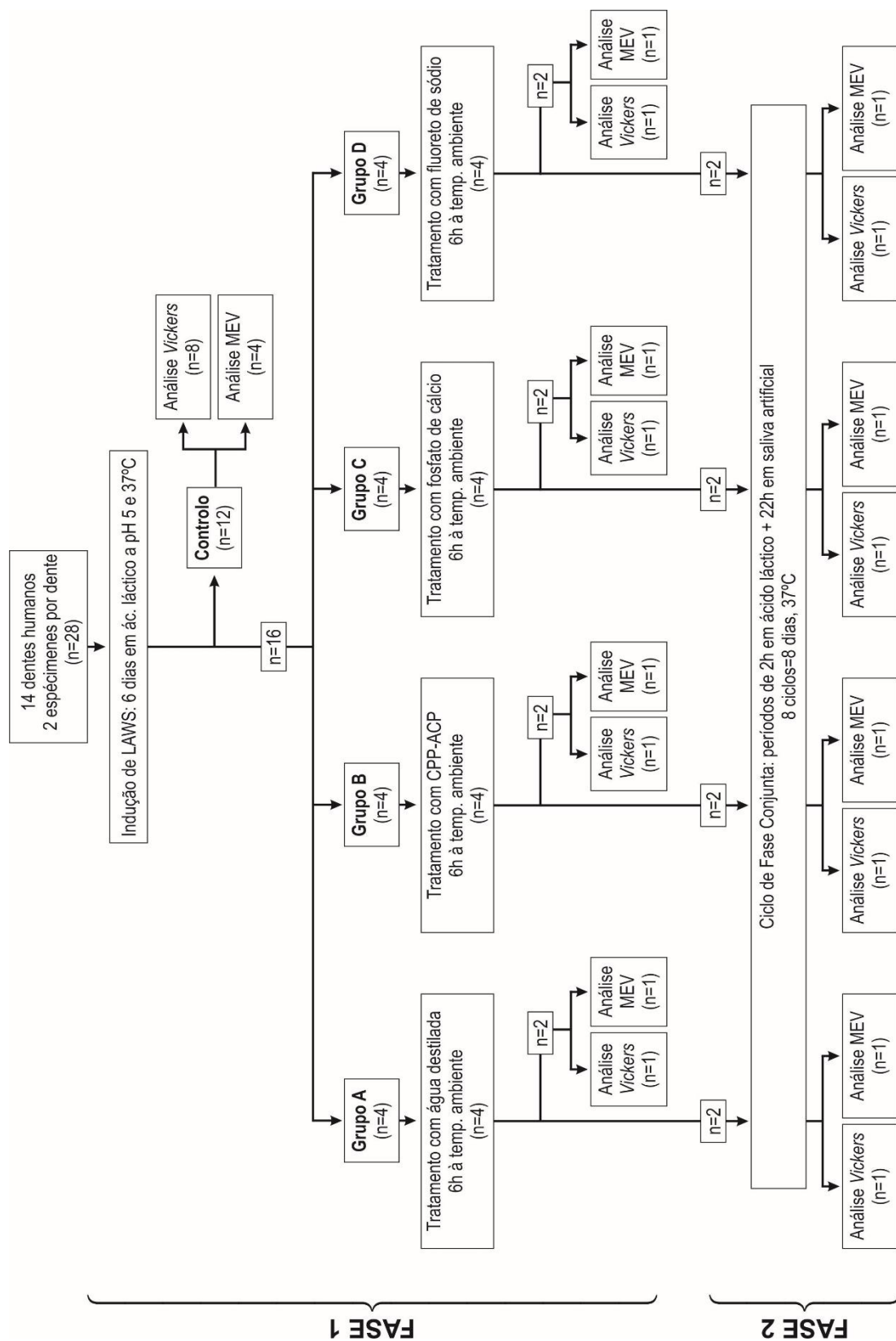


Figura 1. Fluxograma do procedimento experimental

4. SELEÇÃO DA AMOSTRA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMENES

Na seleção da amostra foram contemplados os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão - dentes íntegros, não cariados, livres de fraturas e sem alterações de superfície por exposição a tratamentos químicos ou mecânicos, à exceção dos existentes na higiene dentária dos indivíduos;
- Critérios de exclusão - dentes com malformações, não íntegros, submetidos a tratamentos químicos (branqueamento, entre outros), mecânicos (tratamento ortodôntico prévio, ou outros), ou eletromagnéticos (radiação laser).

Após a seleção dos dentes, removeram-se, com curetas Gracey 3/4 e 5/6, os restos de tecido mole e de tártaro aderido à superfície de cada dente (Caneppele, Jeronymo, Di Nicoló, de Araújo, & Soares, 2012; Jo et al., 2014). Estes restos foram removidos da superfície dentária, preservando-se ao máximo a integridade do esmalte.

A amostra do estudo (N=28), foi obtida de 14 molares humanos tendo as coroas destes molares sido seccionadas, das respectivas raízes, a nível da junção amelocementária (Fig. 3), paralelamente ao plano oclusal, num primeiro corte (Caneppele et al., 2012; F. G. de Carvalho, de Fucio, Sinhoreti, Correr-Sobrinho, & Puppim-Rontani, 2008; Lata, Varghese, & Varughese, 2010; Mohanty, 2014). Cada coroa, dos 14 molares, foi posteriormente hemi-seccionada no sentido vertical, perpendicularmente ao plano oclusal, de forma a obterem-se dois fragmentos: um correspondente a uma porção lingual ou palatina e outro a uma porção vestibular (Jayarajan, Janardhanam, & Jayakumar, 2011), obtendo-se assim a amostra total de 28. Todos estes cortes foram efetuados com uma cortadora Struers Accutom-50 (Fig. 2).



Figura 2. Cortadora Struers Accutom-50 pertencente ao laboratório de biomateriais do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.



Figura 3. Exemplo de como foi efetuado o corte das raízes dos molares humanos.

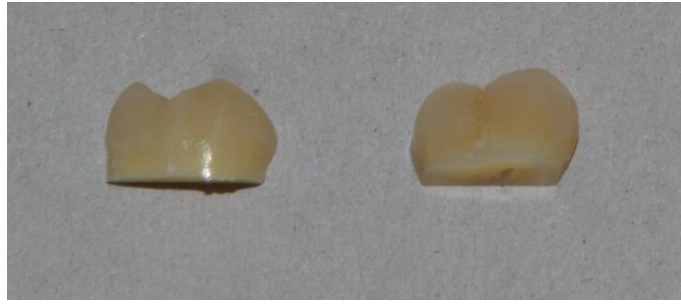


Figura 4. Espécimenes obtidos a partir do corte ocluso-cervical das coroas de molares humanos, exemplificativos da hemi-seção de um dente.

Os 28 espécimenes foram, posteriormente, polidos com um disco de grão fino de carbeto de silício, resistente à água (StruersTM, FEPA paper, granulometria: 320, referencia: FEPA paper P#320) com refrigeração, até apresentarem uma superfície lisa e plana, necessária à análise de Microdureza Vickers e à análise da superfície através de um Microscópio Eletrônico de Varrimento (MEV).

Em cada espécime foi colada fita adesiva (Caneppele et al., 2012) sobre a zona polida, de forma a cobrir uma área de 4x4 mm², correspondente à área da face centro-vestibular ou centro-lingual/palatina a estudar (Caneppele et al., 2012; Heravi, Ahrari, Mahdavi, & Basafa, 2014). Seguidamente, os espécimenes foram cobertos por duas camadas (Heravi et al., 2014) de verniz de unhas vermelho (Caneppele et al., 2012). A fita adesiva teve como objetivo isolar e proteger a zona que se pretendia estudar (janela de estudo – Fig. 5), durante o passo de aplicação do verniz de unhas, (Heravi et al., 2014), e foi removida após a secagem completa deste último (Fig. 6).

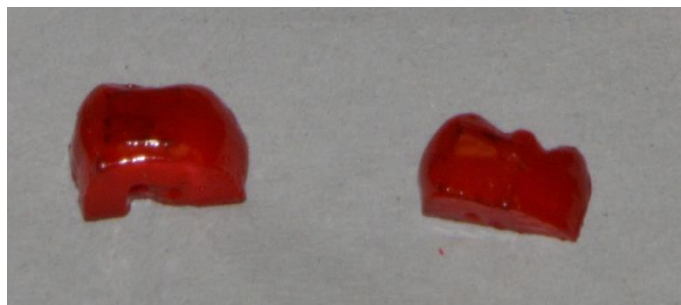


Figura 5. Espécimenes exemplificativos da aplicação da fita adesiva e do verniz de unhas.



Figura 6. Espécimes exemplificativos da retirada da fita adesiva, prontos para a indução de lesões artificiais de *white spot*.

É de grande importância que sejam aplicadas duas camadas de verniz, bem como que este apresente uma cor forte, para que seja facilitado o processo de monitorização do seu estado e da sua permanência na amostra ao longo do estudo.

5. INDUÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO SIMULANDO LESÕES ARTIFICIAIS DE *WHITE SPOT* (FASE 1)

Para a indução de lesões artificiais de *white spot* (LAWS), todos os 28 espécimens, sofreram um processo de desmineralização com uma solução tampão de 50 mL de ácido láctico a pH 5 durante 6 dias (Cardoso et al., 2014), a uma temperatura de 37°C (Jo et al., 2014; Magalhães et al., 2008; G. M. S. Oliveira et al., 2014). A solução tampão de ácido láctico foi preparada com 50 mM de ácido láctico (Fluka® Analytical, SIGMA – ALDRICH, Co., Espanha, lote: #BCBN4919V), 3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio di-hidratado) (MERCK, Darmstadt, Alemanha, lote: TA853682605) e 3 mM KH_2PO_4 (di-hidrogeno fosfato de potássio) (Chem-Lab NV, Zedelgem, Belgica, lote: 21.0070.103, validade: 03/2018), tendo sido o pH ajustado a 5,0 com KOH (L. BCHEM, Lisboa, Portugal, lote: 160512, validade: 03/2017), (Buskes, Christoffersen, & Arends, 1985; Cardoso et al., 2014).



Figura 7. Preparação da solução tampão de ácido láctico usado, na indução de lesões artificiais de *white spot*.

Foram induzidas LAWS para que posteriormente pudesse ser analisado o efeito remineralizante de três agentes indutores de remineralização. Para a indução destas lesões foi usado ácido láctico, uma vez que é este o produto da metabolização da lactose e dos hidratos de carbono efetuada pelas bactérias *S. mutans* e *Lactobacillus spp*, sendo estas as principais responsáveis pela cárie dentária (Bowen, 2002; Cummins, 2013).

A utilização deste ácido a pH 5 deve-se ao facto de o pH crítico da hidroxiapatite, ou seja, pH abaixo do qual existe desmineralização, ser de 5,5 (Larsen & Pearce, 2003).

Durante a indução da desmineralização, os espécimenes foram incubados a 37°C de forma a recriar a temperatura média corporal.

6. ALEATORIZAÇÃO DA AMOSTRA E APLICAÇÃO DOS AGENTES INDUTORES DE REMINERALIZAÇÃO

Após a indução das LAWS aos 28 espécimes, foram, aleatoriamente, retirados 8 espécimes usados para controlo em testes de microdureza de Vickers (n=8), e 4 espécimes usados para controlo em análise de superfície em MEV (n=4) (Jayarajan et al., 2011; Lippert & Lynch, 2014). Os restantes 16 espécimes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos distintos. Assim:

Grupo A (n=4) – Controlo positivo

- 4 espécimes imersos em água desionizada, durante 6 horas, à temperatura ambiente. Destes:
 - 2 espécimes usados em: testes de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1) (Fase 1);
 - 2 Espécimes, seguidos prospectivamente e submetidos a Ciclo de Fase Conjunta (CFC), para teste de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1) (ver fase 2 e protocolo de ciclo de desmineralização com ácido láctico e remineralização com saliva artificial – CFC);

Grupo B (n=4) – Grupo de estudo

- 4 espécimes tratados com gel de CPP-ACP, segundo as instruções do fabricante, com 7,1 (gel de caseína fosfopeptídea - fosfato de cálcio amorfo) (GC Tooth Mousse, Recaldent™, GC Europe, lote: 130304V, validade: 03/2015). Após este tratamento, os espécimes foram imersos em água desionizada durante 6 horas à temperatura ambiente (Cardoso et al., 2014; Magalhães et al., 2008). Destes:
 - 2 espécimes foram usados em: testes de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1) (ver Fase 1);
 - 2 Espécimes, seguidos prospectivamente e submetidos a CFC para teste de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1) (ver fase 2 e protocolo de CFC);



Figura 8. Gel de CPP-ACP (GC Tooth Mousse, Recaldent).

Grupo C (n=4) – Grupo de estudo

- 4 espécimenes, nos quais se aplicou um verniz de fosfato de cálcio (<5%), com pH 6.8, seguindo as instruções do fabricante (Clinpro™ White Varnish, 3M ESPE, Neuss, Alemanha, lote: N604384 e validade: 08/2016). Após este tratamento, os espécimenes foram imersos em água desionizada durante 6 horas à temperatura ambiente (Cardoso et al., 2014; Magalhães et al., 2008).

Destes:

- 2 espécimenes foram usados em: testes de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1) (Fase 1);
- 2 espécimenes, seguidos prospectivamente e submetidos a Ciclo de Fase Conjunta (CFC), para teste de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1), (ver fase 2 e protocolo de CFC);



Figura 9. Verniz de fosfato de cálcio (Clinpro™ White Varnish, 3M ESPE).

Grupo D (n=4) – Grupo de estudo

- 4 espécimes, nos quais se aplicou um Verniz de Fluoreto de Sódio a 5%, segundo as instruções do fabricante, com pH 6.64 (Profluorid® Varnish, VOCO, Cuxhaven, Alemanha, lote: 1536583, validade: 05/2017). Após este tratamento, os espécimes foram imersos em água desionizada durante 6 horas à temperatura ambiente (Cardoso et al., 2014; Magalhães et al., 2008). Destes:

- 2 espécimes foram usados em: testes de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1) (Fase 1);
- 2 Espécimes, seguidos prospectivamente e submetidos a Ciclo de Fase Conjunta (CFC), para teste de microdureza Vickers (n=1) e MEV (n=1), (ver fase 2 e protocolo de CFC);



Figura 10. Verniz de fluoreto de sódio (Profluorid® Varnish, VOCO).

7. CICLO DE FASE CONJUNTA (FASE 2):

Os espécimes de cada grupo foram sujeitos a um ciclo de desmineralização (com ácido láctico) e remineralização (com saliva artificial), conhecido por ciclo de fase conjunta (CFC). Para tal, os 8 espécimes foram mergulhados, separadamente, numa solução tampão de ácido láctico a pH 5 (preparada conforme descrito no ponto 5) por um período de 2h (Queiroz, Hara, Paes Leme, & Cury, 2008) a 37°C. Findas as 2h, todos os espécimes foram retirados das soluções tampão de ácido láctico e lavados com água desionizada. Posteriormente, os espécimes foram colocados em *gobelets* com saliva artificial a pH 7, onde permaneceram por um período de 22h a 37°C (fase de remineralização) (Cardoso et al., 2014; Queiroz et al., 2008), concluindo assim um ciclo.



Figura 11. Imagem exemplificativa da imersão dos espécimes constituintes de um grupo num *gobelet* contendo saliva artificial.

Este processo foi repetido por um período de 8 dias, o que perfaz um total de 8 ciclos, renovando as soluções de desmineralização (solução tampão de ácido láctico) e remineralização (saliva artificial) ao fim de 4 dias (Cardoso et al., 2014; Queiroz et al., 2008). Na preparação da saliva artificial utilizada no CFC, foram usados 0,005 g de

$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sulfeto de sódio nano-hidratado) (Baker Analyzed, Deventer, Holanda, lote: G43334), 0,4 g de NaCl (cloreto de sódio) (Labsolve, Odivelas, Portugal, lote: 493975, validade: 05/2020), 0,4 g de KCl (cloreto de potássio) (Prolabo – VWR chemicals, Leuven, Bélgica, lote: 13C250023, validade: 03/2018), 0,69 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado) (Prolabo – VWR chemicals, Leuven, Bélgica, lote: 14D250003, validade: 04/2019), 1 g de Ureia (Panreac, Barcelona, Espanha, lote: 269745, validade: 09/2016), 0,2 g de CaCl_2 (cloreto de cálcio) (Merck, Darmstadt, Alemanha, lote: K37155478747) e 1000 mL de água desionizada (Urban et al., 2009).

8. TESTE DE MICRODUREZA DE VICKERS

O teste de microdureza de Vickers foi efetuado na fase 1 e na fase 2, de todos os grupos, tendo o equipamento sido calibrado entre cada espécime analisado. Assim:

Fase 1:

- Controlo inicial, de todos os grupos (n=8);
- Grupo A (n=1) , Grupo B (n=1), Grupo C (n=1) e Grupo D (n=1);

Fase 2 - CFC

- Grupo A (n=1) , Grupo B (n=1), Grupo C (n=1) e Grupo D (n=1);

Foi usada a máquina HSV-30® (Shimadzu) (Fig. 10), com uma carga de 29,42 N durante 5 segundos (Fig. 11 e 12). Realizaram-se 5 indentações em cada espécime/medição, de forma a garantir a aleatoriedade dos resultados e dos locais analisados, o que fez um total de 80 indentações: 8 medições no início da fase 1 do estudo, 4 medições no fim desta mesma fase e 4 medições após o CFC (fase 2). Calculou-se a média e o desvio padrão de dureza de cada elemento e de cada subgrupo. Os resultados foram tratados de forma quantitativa, organizados em excel numa tabela comparativa, e tratados com medidas de tendência central (média e desvio padrão).



Figura 12. Máquina HSV-30® (Shimadzu) usada nos testes de Microdureza de Vickers.



Figura 13. Análise da microdureza de superfície de um espécime pela técnica de Vickers.

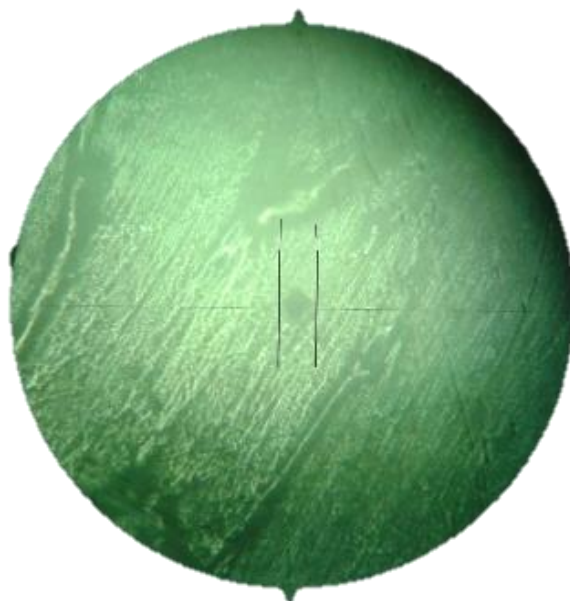


Figura 14. Imagem observada durante o teste de microdureza de superfície de Vickers.

8. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO ELETRÓNICO DE VARRIMENTO

Todos os espécimenes (fase 1 e fase 2) foram recobertos com uma liga de ouro/paládio a 20 mA e 1,4 kV durante 3 minutos, usando um Sputter Coater Polaron, cedido pelo Instituto Superior Técnico. De seguida, as amostras foram observadas por microscopia eletrónica de varrimento em sinal de eletrões secundários usando um instrumento JEOL JSM-700001F (Fig. 15). Os espécimenes para análise ao MEV, distribuíram-se da seguinte forma:

Fase 1:

- Controlo inicial, de todos os grupos (n=4);
- Grupo A (n=1), Grupo B (n=1), Grupo C (n=1) e Grupo D (n=1);

Fase 2 - CFC

- Grupo A (n=1), Grupo B (n=1), Grupo C (n=1) e Grupo D (n=1);

Os resultados foram tratados de forma qualitativa e comparativa, utilizando as ampliações de x1000, x10000 e x30000.



Figura 15. Microscópio Eletrônico de Varrimento (JEOL JSM-700001F) do Instituto Superior Técnico.

III - RESULTADOS

Os valores de pH de cada um dos agentes remineralizantes utilizados foram medidos e encontram-se descritos na seguinte tabela:

Tabela 1. Valores obtidos na medição do pH dos agentes remineralizantes utilizados.

Agente remineralizante	Valores de pH
Gel de CPP-ACP	7,1
Verniz de fosfato de cálcio	6,8
Verniz de fluoreto de sódio	6,64

Fase 1:

Após a indução de LAWS, e antes da aleatorização dos grupos, foram analisados 8 espécimes quanto à sua microdureza de superfície, pelo método de Vickers, e observados 4 espécimes em MEV, para controlo inicial. Os resultados obtidos foram quantificados em Dureza Vickers e Mega Pascal (MPa), (ver tabela 1) e qualificados através das imagens qualitativas do MEV (ver Fig. 16, 17 e 18).

Tabela 2. Valores de Microdureza de Vickers obtidos na fase 1, após a indução de LAWS.

Espécimes/ Indentações	E1 Dureza Vickers/MPa		E2 Dureza Vickers/MPa		E3 Dureza Vickers/MPa		E4 Dureza Vickers/MPa		E5 Dureza Vickers/MPa		E6 Dureza Vickers/MPa		E7 Dureza Vickers/MPa		E8 Dureza Vickers/MPa	
1	260	2549,82	44,7	438,37	210	2059,47	96,2	943,43	72,6	711,99	66	647,26	88,8	870,86	105	1029,74
2	64,3	630,59	70,1	687,47	172	1686,80	78,3	767,89	107	1049,35	70,4	690,41	80,7	791,43	76,8	753,18
3	54,4	533,50	78,3	767,89	174	1706,42	62,5	612,94	66,5	652,17	52,2	511,93	36,8	360,90	62,7	614,90
4	50,1	491,33	64,4	631,57	217	2128,12	186	1824,10	86,2	845,36	67,5	661,97	97,3	954,22	46,1	452,10
5	62,8	615,88	71,3	699,24	224	2196,77	60,9	597,25	72	706,10	44,6	437,39	102	1000,31	57,2	560,96
Média	98,32	964,22	65,76	644,91	199,4	1955,52	96,78	949,12	80,86	792,99	60,14	589,79	81,12	795,54	69,56	682,18
Desvio Padrão	90,57	888,25	12,77	125,22	24,61	241,38	51,88	508,75	16,32	160,00	11,16	109,46	26,08	255,79	22,69	222,48
Média Total	93,99 / 921,79 MPa															
Desvio Padrão Total	56,18 / 550,92															

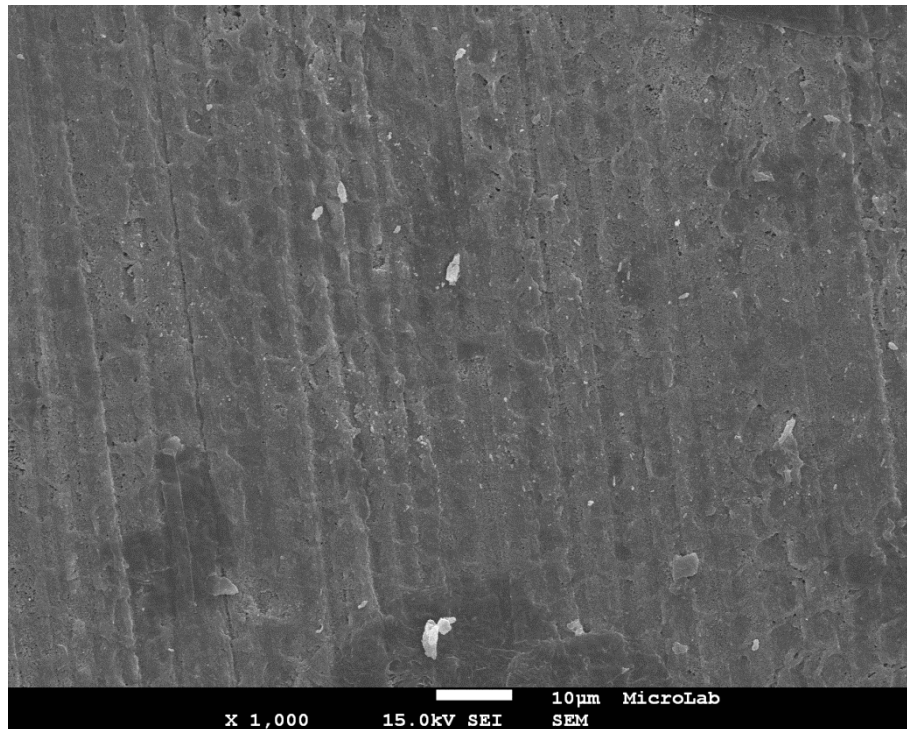


Figura 16. Imagem exemplificativa de visão panorâmica sobre a superfície do Esmalte a x1000, após indução de Lesões Artificiais de *white spot* – controle inicial.

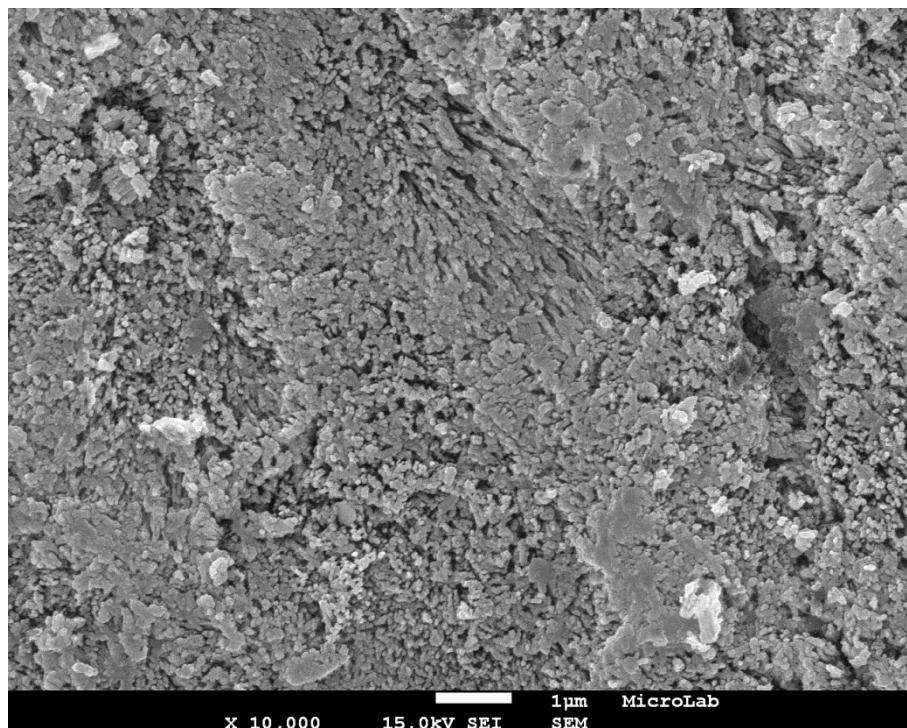


Figura 17. Imagem exemplificativa de visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de lesões artificiais de *white spot* – controle inicial. Observa-se desorganização estrutural do esmalte, tanto dos prismas como de substância interprismática, com distintas orientações.

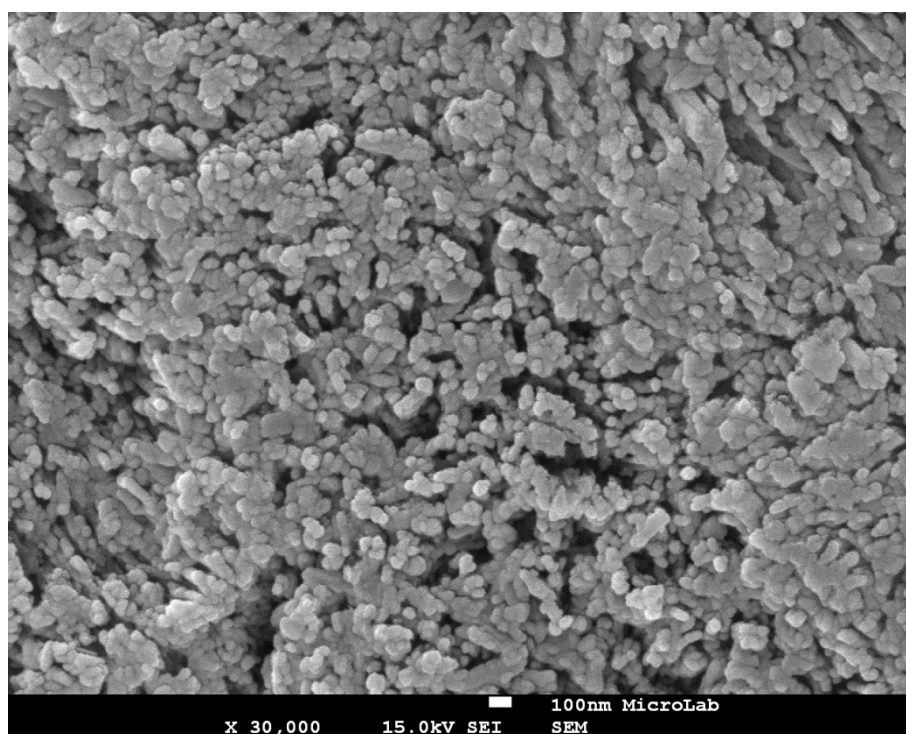


Figura 18. Imagem exemplificativa de visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesões artificiais de *white spot* – controlo inicial. A desorganização dos cristais é mais evidente, assumindo planos de destruição heterogêneos e com aspeto lacunar.

Após a aleatorização dos grupos (A, B, C e D), obtiveram-se os seguintes resultados:

Grupo A (n=1: análise de microdureza)

Tabela 3. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo A, 6h após a aplicação de água desionizada (grupo controlo positivo).

Grupo A - Controlo						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	60,1			589,4007		
2	31,7			310,8819		
3	94,1			922,8387		
4	36,7			359,9169		
5	60,9	56,7	24,76368	597,2463	556,0569	242,8574

Grupo A (n=1: observação ao MEV)

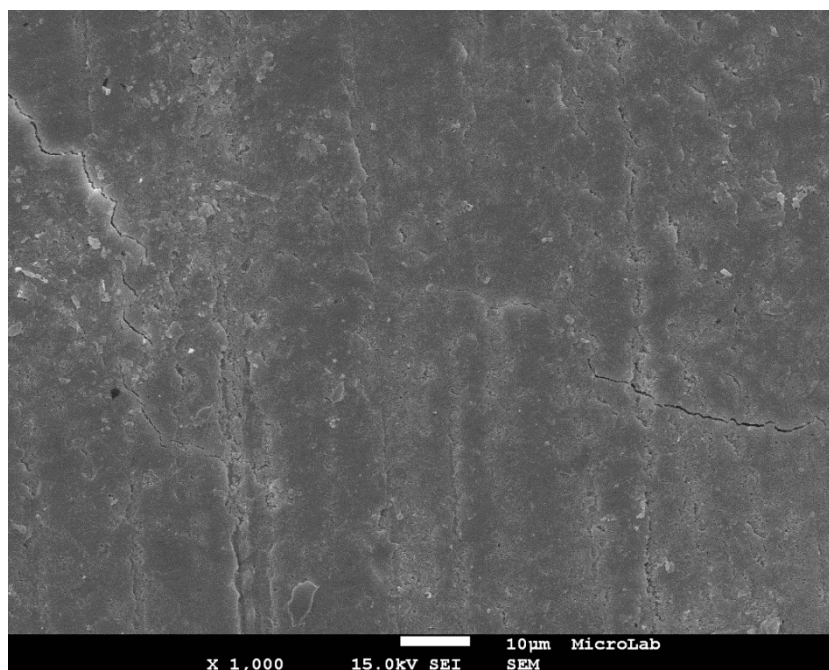


Figura 19. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot* e imersão em água desionizada (grupo controlo positivo). Observam-se fraturas de esmalte por tensão e orientação dos prismas.

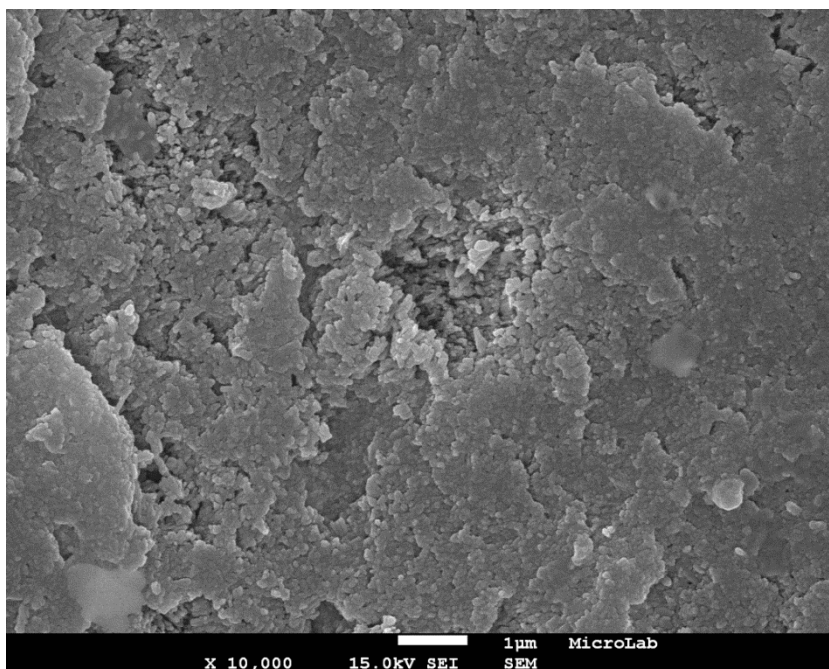


Figura 20. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot* e imersão em água desionizada (grupo controlo). Observa-se desorganização da substância prismática e interprismática, mantendo um aspeto de distintos planos lacunares.

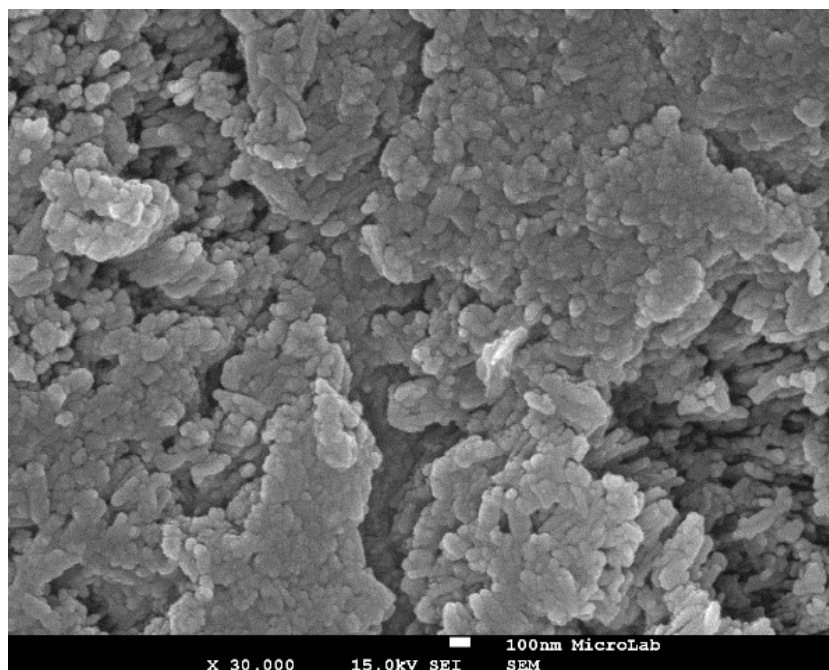


Figura 21. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot* e imersão em água desionizada (grupo controle). Observa-se desorganização de cristais e sua fratura, por camadas, assumindo as mesmas distinta orientação e aspeto lacunar.

Grupo B (n=1: análise de microdureza)

Tabela 4. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo B, 6h após a aplicação do agente remineralizante – gel de CPP-ACP.

Grupo B – Gel de CPP-ACP						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	357			3501,099		
2	267			2618,469		
3	259			2540,013		
4	285			2794,995		
5	282	290	38,94868	2765,574	2844,03	381,9697

Grupo B (n=1: Observação ao MEV)

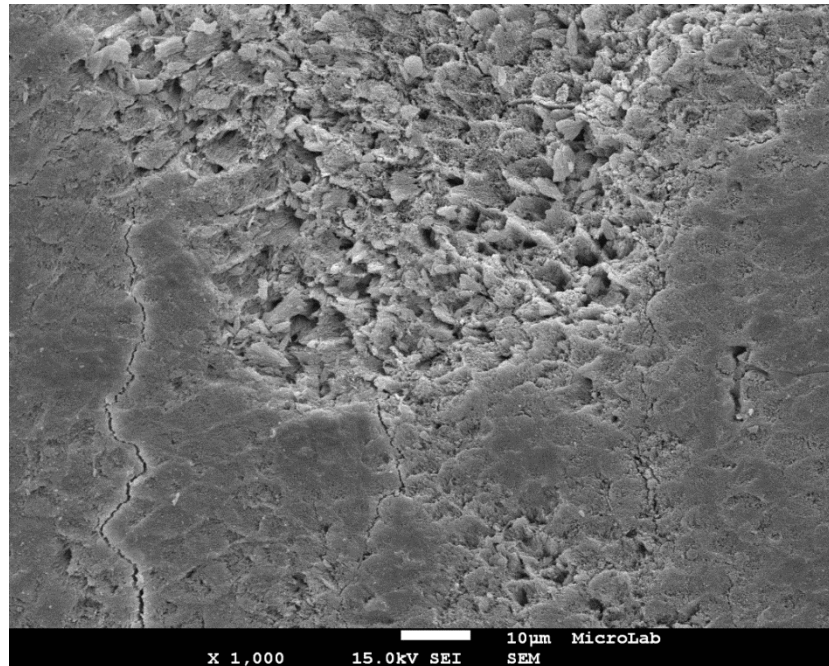


Figura 22. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com gel de CPP-ACP. Observam-se zonas de desmineralização dos prismas, assumindo a mesmo um aspeto de “favo de mel”, e zonas recobertas com CPP-ACP, com deposição de fosfato e cálcio sobre a sua superfície.

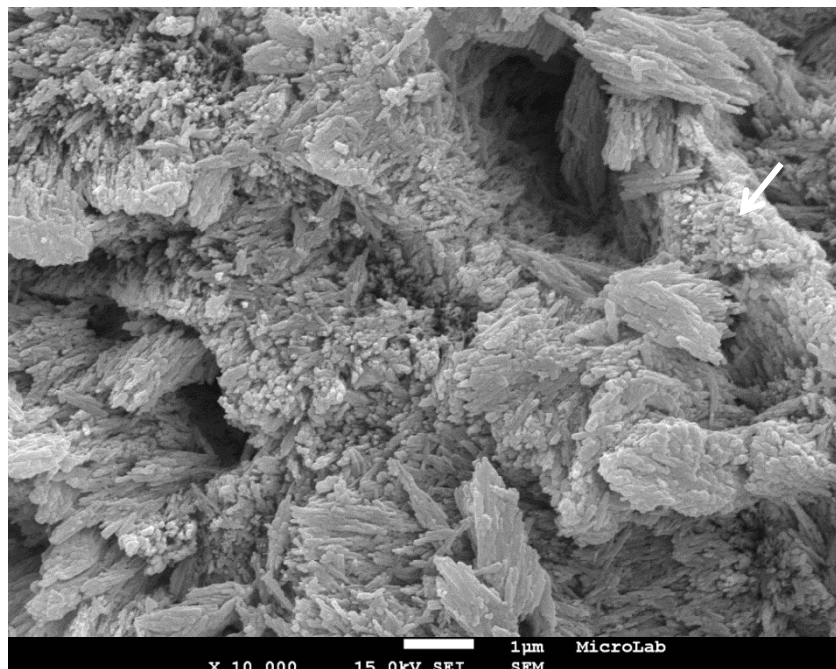


Figura 23. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com gel de CPP-ACP, observam-se zonas de heterogêneas de desorganização de prismas de esmalte, e na ampliação dos “favos de mel”, observamos depósitos compatíveis, com hiper-mineralização por CPP-ACP.

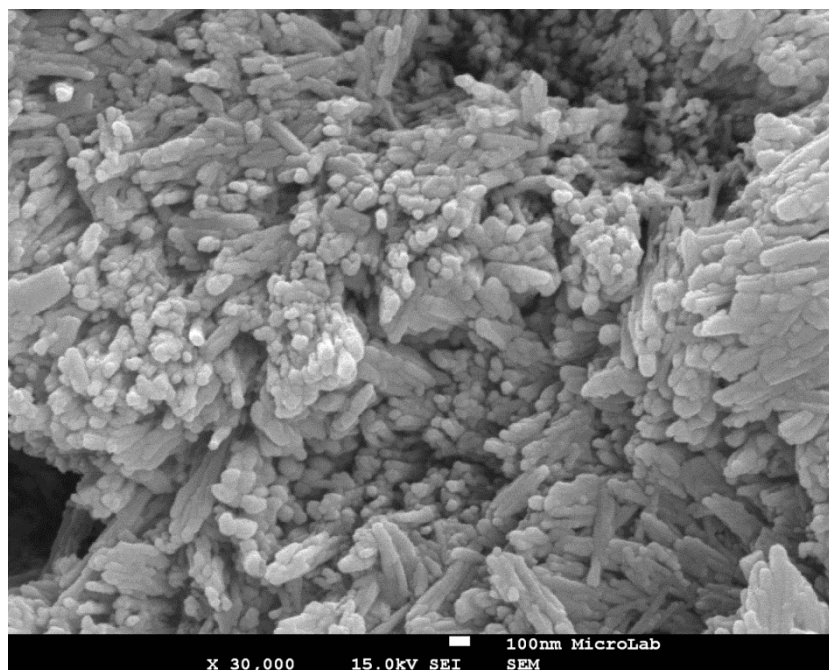


Figura 24. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com gel de CPP-ACP. Observam-se, distintas zonas, heterogêneas, mas agregadas entre si, sugestivas de deposição mineral compatível com CPP-ACP.

Grupo C (n=1: análise de microdureza)

Tabela 5. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo C, 6h após a aplicação do agente remineralizante – verniz de fosfato de cálcio.

Grupo C – Verniz de fosfato de cálcio						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	129			1265,103		
2	184			1804,488		
3	89,3			875,7651		
4	215			2108,505		
5	62,7	136	63,53696	614,8989	1333,752	623,1069

Grupo C (n=1: observação ao MEV)

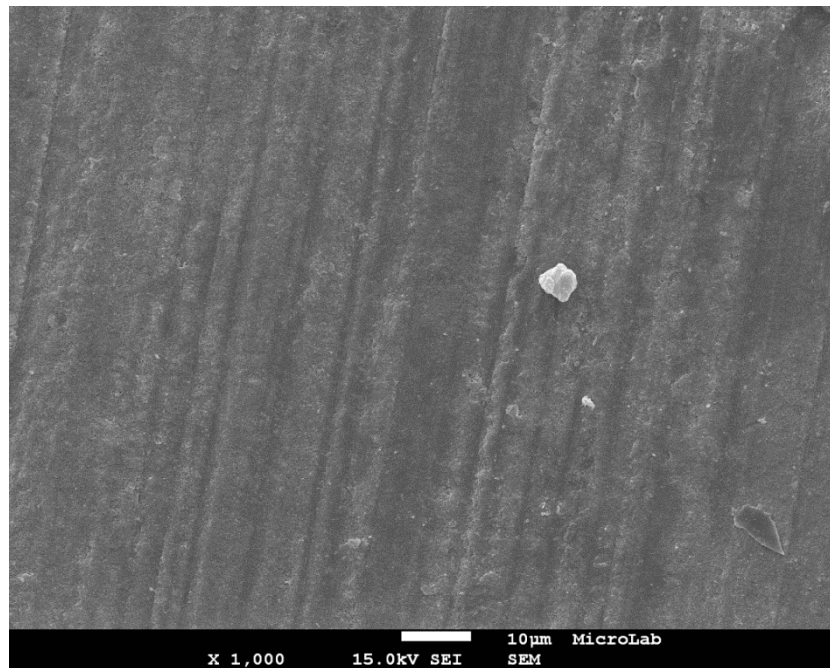


Figura 25. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com verniz de fosfato de cálcio.

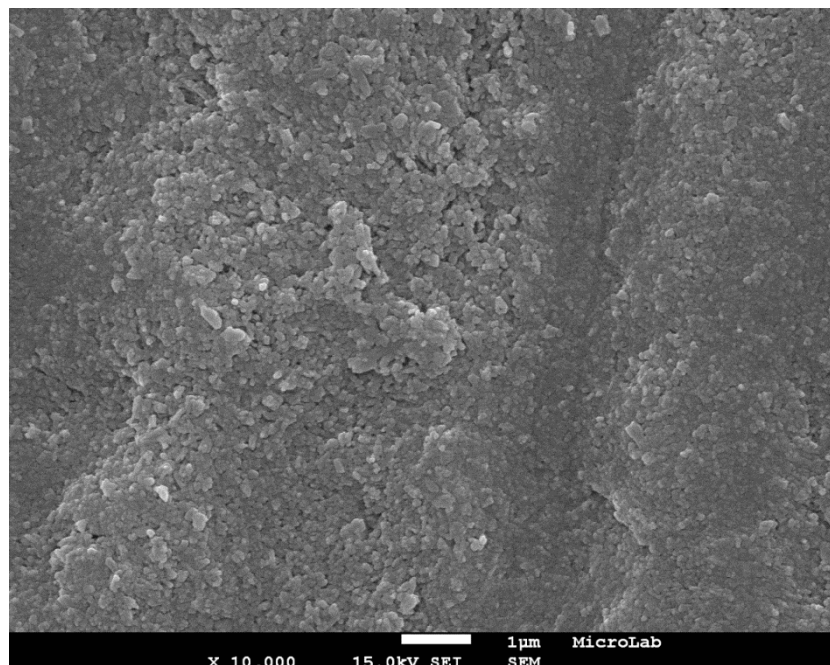


Figura 26. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com verniz de fosfato de cálcio. Observam-se zonas homogêneas sobre os prismas de esmalte e com aglomeração mineral na sua superfície compatível com a aplicação de fosfato de cálcio.

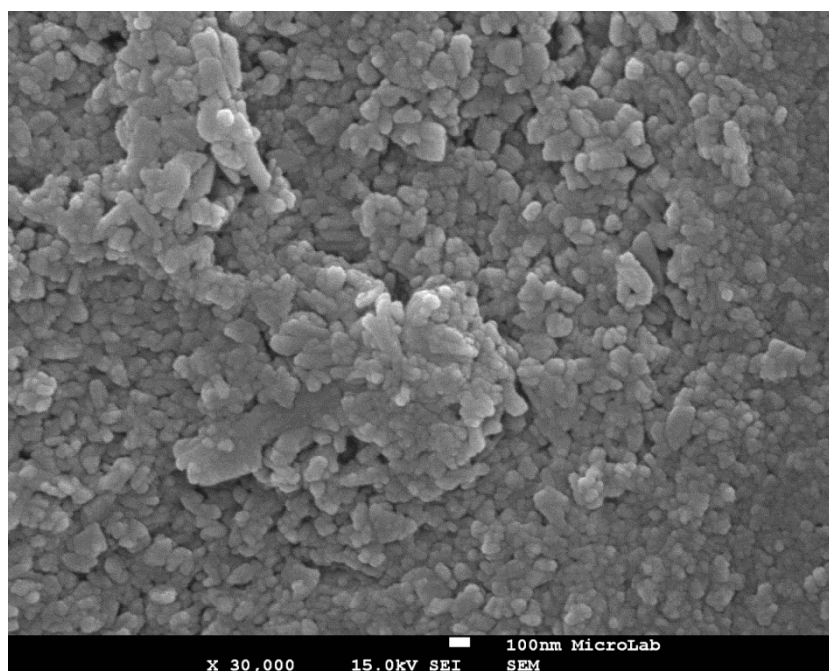


Figura 27. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com verniz de fosfato de cálcio. Observam-se zonas homogêneas sobre os prismas de esmalte e com aglomeração mineral na sua superfície compatível com a aplicação de fosfato de cálcio, com evidente preenchimento de espaços lacunares.

Grupo D (n=1: análise de microdureza)

Tabela 6. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers de um espécime do grupo D, 6h após a aplicação do agente remineralizante – verniz de fluoreto de sódio.

Grupo D – Verniz de fluoreto de sódio						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	186			1824,102		
2	149			1461,243		
3	213			2088,891		
4	207			2030,049		
5	365	224	82,70429	3579,555	2196,768	811,081

Grupo D (n=1: observação ao MEV)

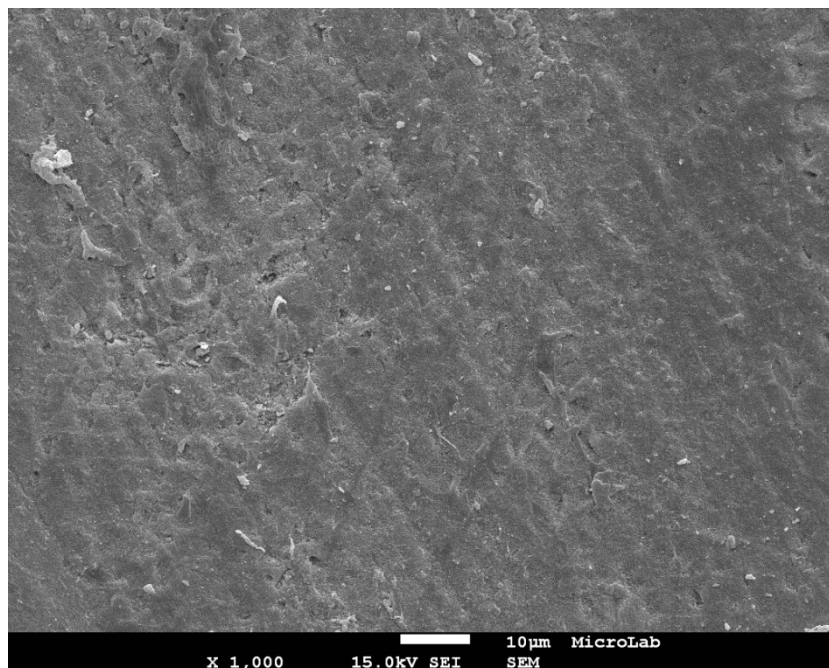


Figura 28. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com verniz de fluoreto de sódio.

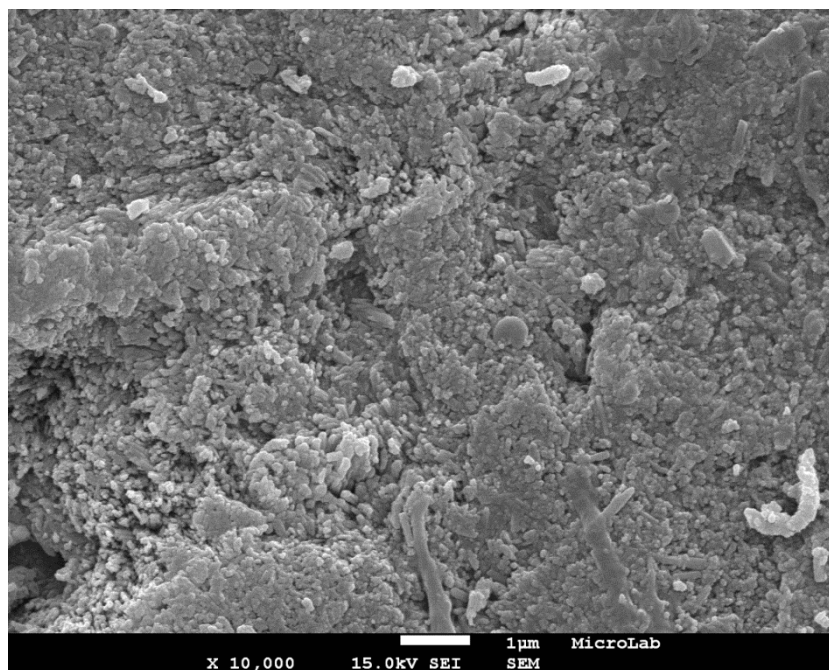


Figura 29. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com verniz de fluoreto de sódio. Observam-se zonas heterogêneas de hiper-remineralização compatíveis com a aplicação de fluoreto de sódio e depósito de substância interprismática.

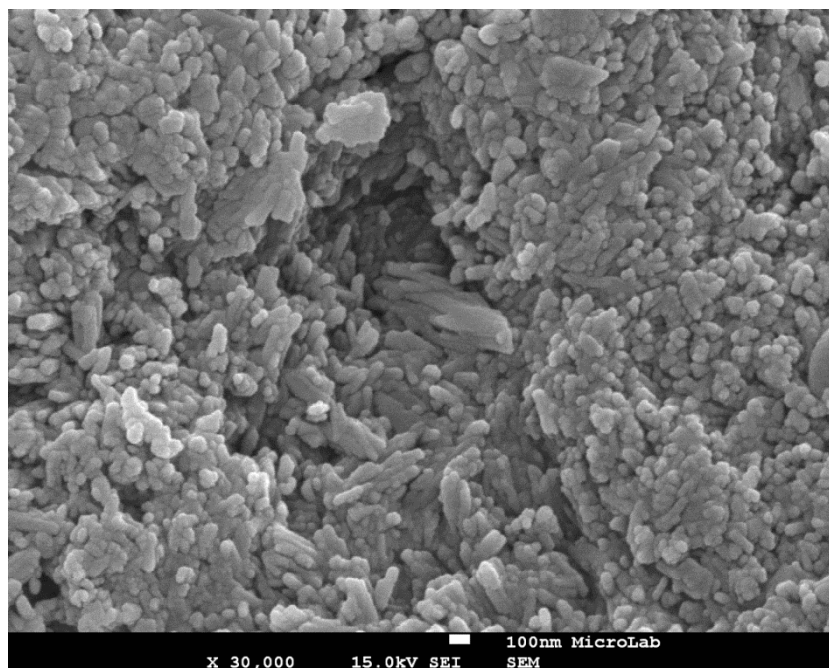


Figura 30. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot* e tratamento com verniz de fluoreto de sódio. Constatam-se zonas de maior homogeneidade, e deposição mineral, compatíveis com a aplicação de fluoreto de sódio.

Pode observar-se que, 6 h após a aplicação de um agente remineralizante, os valores de microdureza de superfície do esmalte são mais elevados no grupo B (290 HV), quando comparados com o Grupo A (56,7 HV), C (136 HV) e D (224 HV). O verniz de fosfato de cálcio é o agente remineralizante cujo esmalte tratado apresenta valores de microdureza de superfície mais baixos. Relativamente à observação MEV, nesta fase, os Grupos C e D, apresentam superfícies mais homogêneas de complexos minerais na sua superfície, quando comparados qualitativamente com os Grupos A e B.

Fase 2:

Descrevem-se os resultados do CFC, para os testes de microdureza de superfície e observação em MEV. Assim:

Grupo A (n=1: análise de microdureza)

Tabela 7. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo A, após a aplicação do AR – água desionizada (grupo controle) e o CFC.

Grupo A após CFC						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	112			1098,384		
2	157			1539,699		
3	119			1167,033		
4	73,5			720,8145		
5	122	116,7	29,77331	1196,454	1144,477	291,9869

Grupo A (n=1: observação ao MEV)

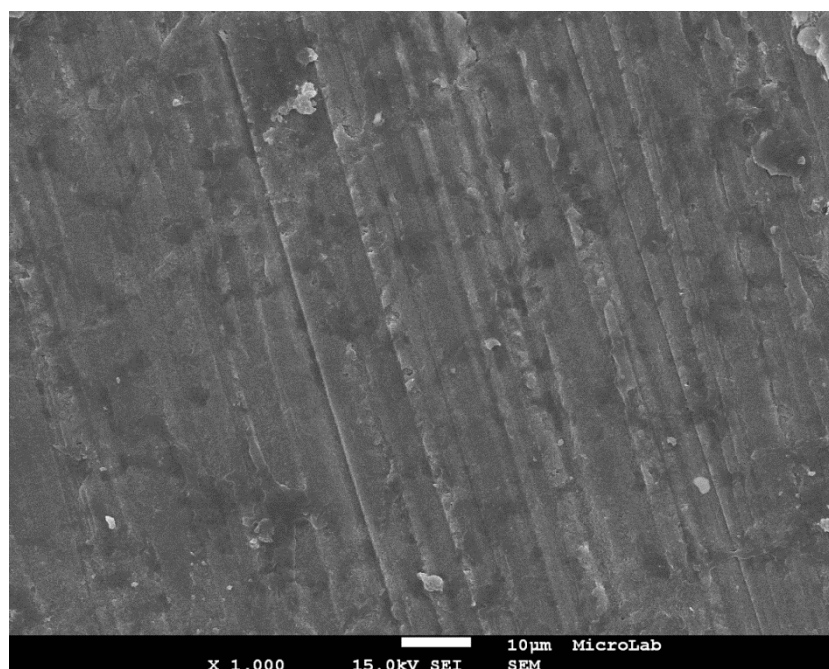


Figura 31. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com água desionizada e CFC, onde é notória a orientação dos prismas.

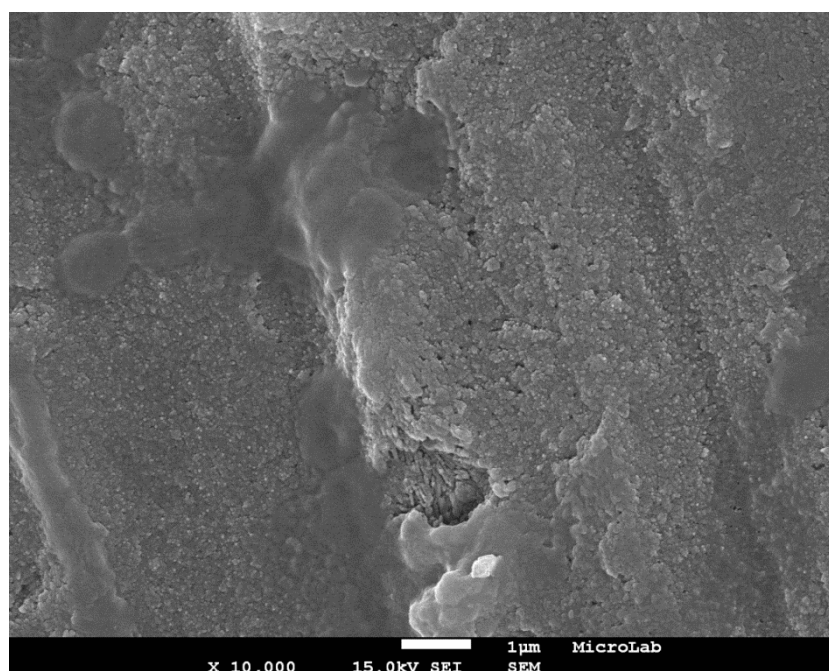


Figura 32. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com água desionizada e CFC, com zonas de desmineralização e reorganização mineral.

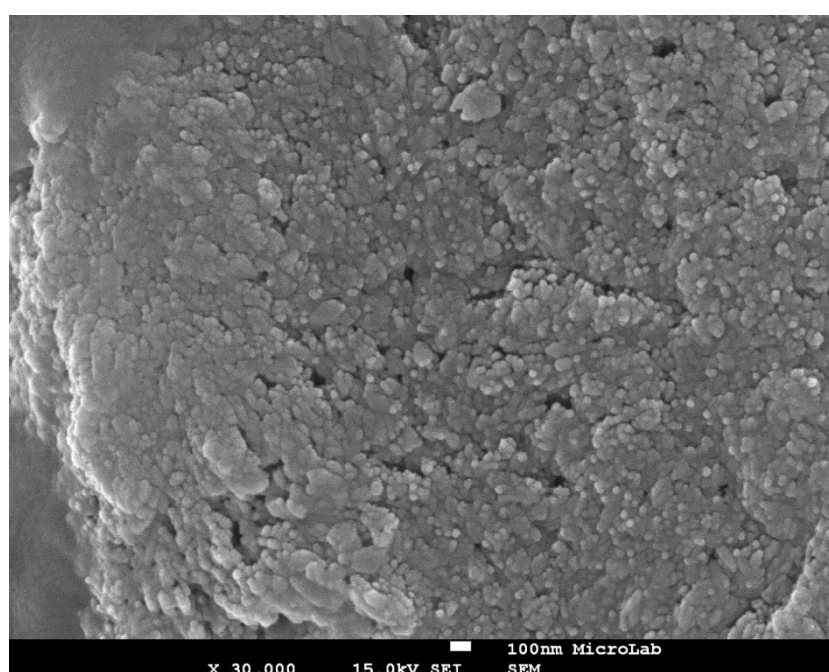


Figura 33. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com água desionizada e CFC, com zonas de desmineralização e reorganização mineral.

Grupo B (n=1: análise de microdureza)

Tabela 8. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo B, após a aplicação do agente remineralizante – gel de CPP-ACP e o CFC.

Grupo B após CFC						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	256			2510,592		
2	262			2569,434		
3	260			2549,82		
4	318			3118,626		
5	238	266,8	30,15294	2334,066	2616,508	295,7099

Grupo B (n=1: observação ao MEV)

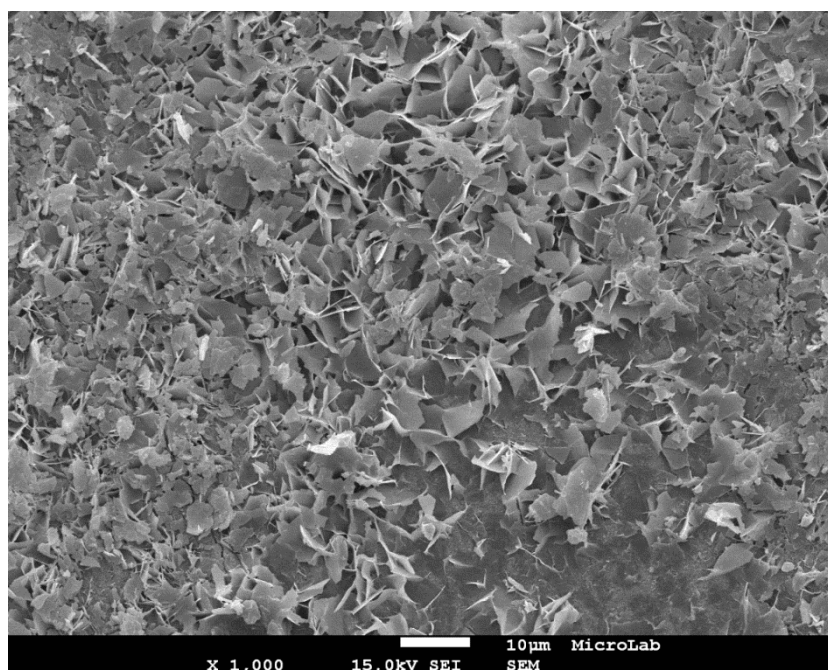


Figura 34. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um gel de CPP-ACP e CFC, onde se observa uma zona de desorganização e fratura de prismas de esmalte, sem substância interprismática em diferentes planos e com depleção de fosfato de cálcio.

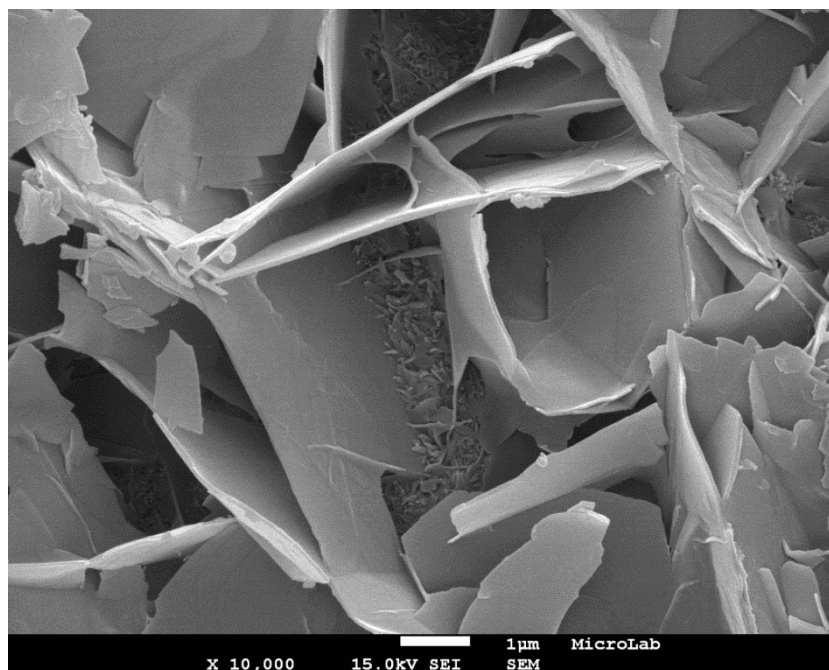


Figura 35. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um gel de CPP-ACP e CFC, evidenciando a destruição da sua estrutura cristalina, com várias lacunas no complexo da hidroxiapatite.

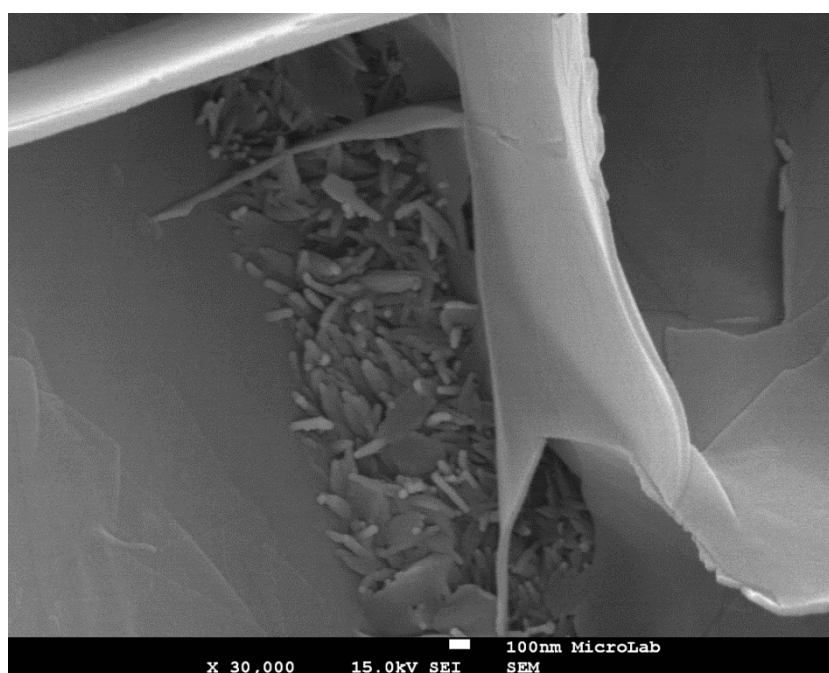


Figura 36. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um gel de CPP-ACP e CFC, evidenciando a destruição da sua estrutura cristalina, com várias lacunas, mais profundas, no complexo da hidroxiapatite e depleção de fosfato de cálcio.

Grupo C (n=1: análise de microdureza)

Tabela 9. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo C, após a aplicação do AR – verniz de fosfato de cálcio e CFC.

Grupo C após CFC						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	316			3099,012		
2	185			1814,295		
3	225			2206,575		
4	315			3089,205		
5	268	261,8	57,13755	2628,276	2567,473	560,348

Grupo C (n=1: observação ao MEV)

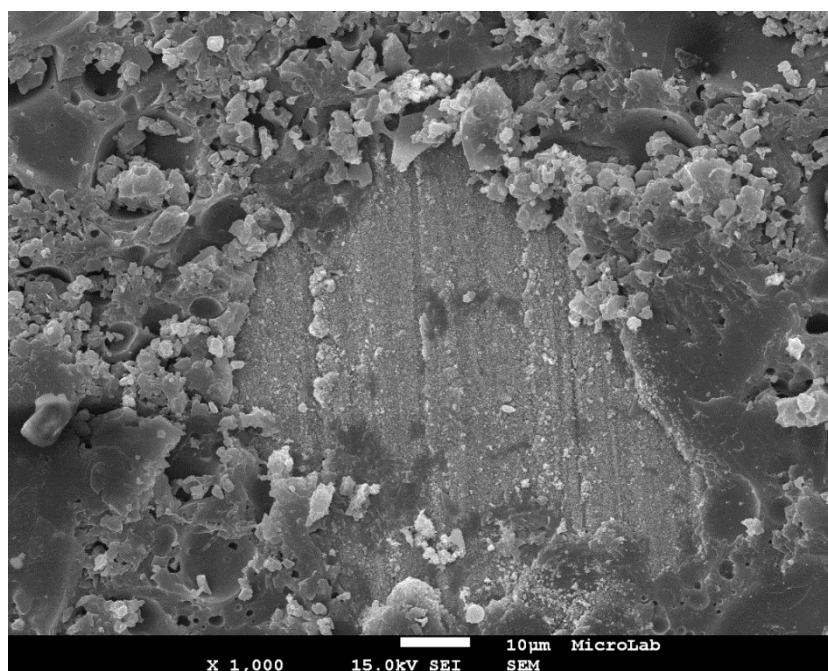


Figura 37. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um verniz de fosfato de cálcio e CFC, onde se observa precipitado de fluoreto e fosfato de cálcio.

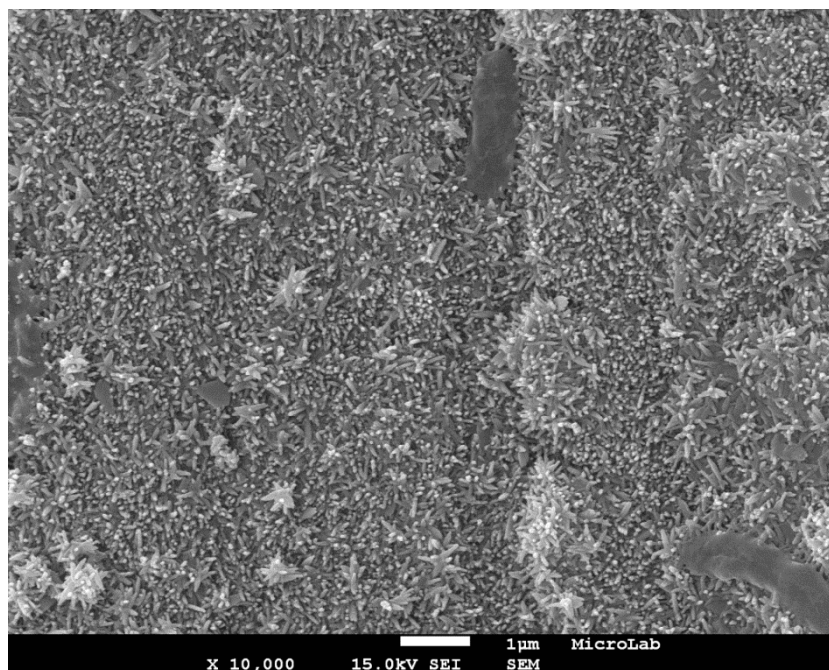


Figura 38. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um verniz de fosfato de cálcio e CFC, onde se observam várias zonas de precipitado de fluoreto e fosfato de cálcio.

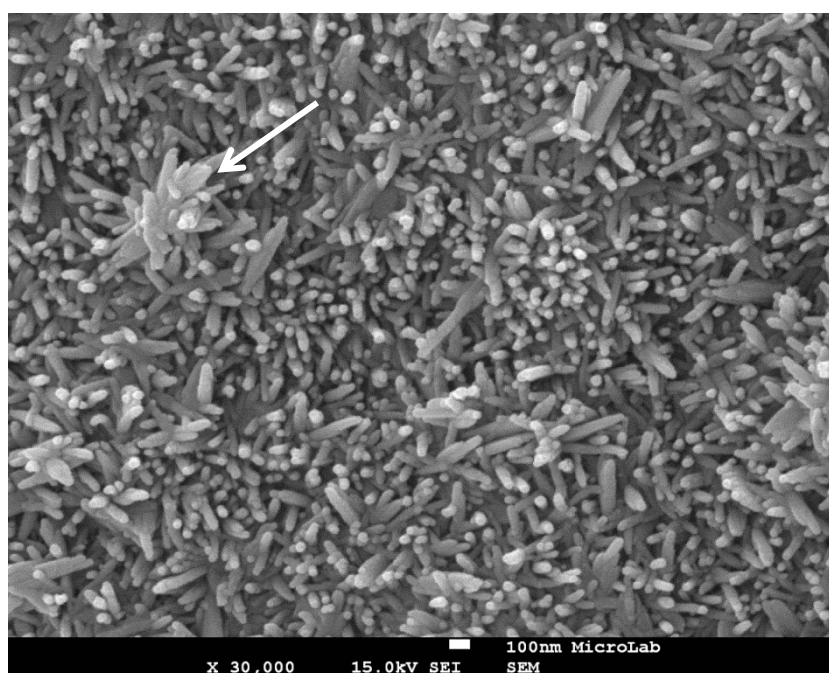


Figura 39. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um verniz de fosfato de cálcio e CFC, onde se observam várias zonas de precipitado de fluoreto e fosfato de cálcio, e reorganização desta camada superficial.

Grupo D (n=1: análise de microdureza)

Tabela 10. Valores obtidos na análise de microdureza de superfície de Vickers ao espécime do grupo D, após a aplicação do AR – verniz de fluoreto de sódio e CFC.

Grupo D após CFC						
Nº de indentações	[HV]	Média	DesvPadr	[MPa]	Média	DesvPadr
1	155			1520,085		
2	129			1265,103		
3	154			1510,278		
4	175			1716,225		
5	181	158,8	20,49878	1775,067	1557,352	201,0315

Grupo D (n=1: observação ao MEV)

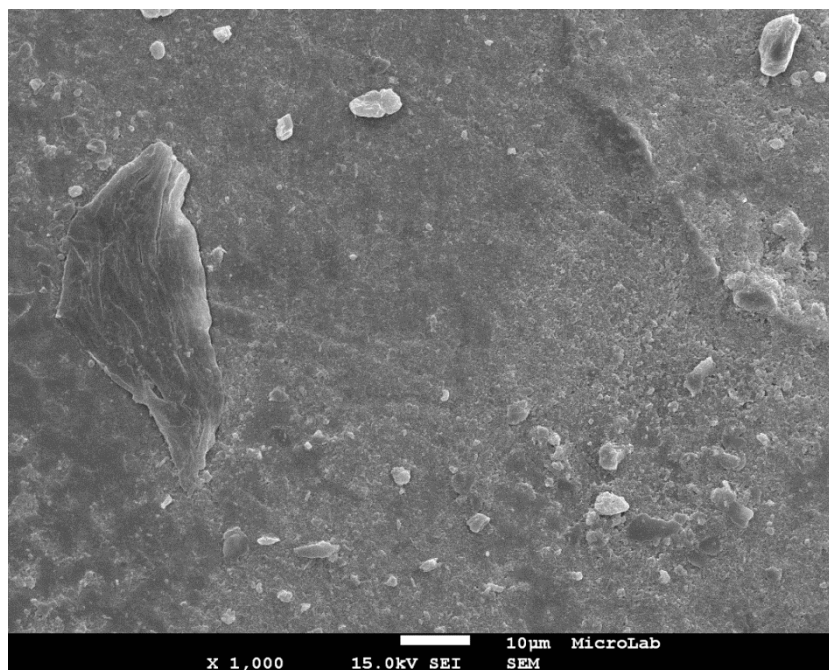


Figura 40. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x1000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um verniz de fluoreto de sódio e CFC.

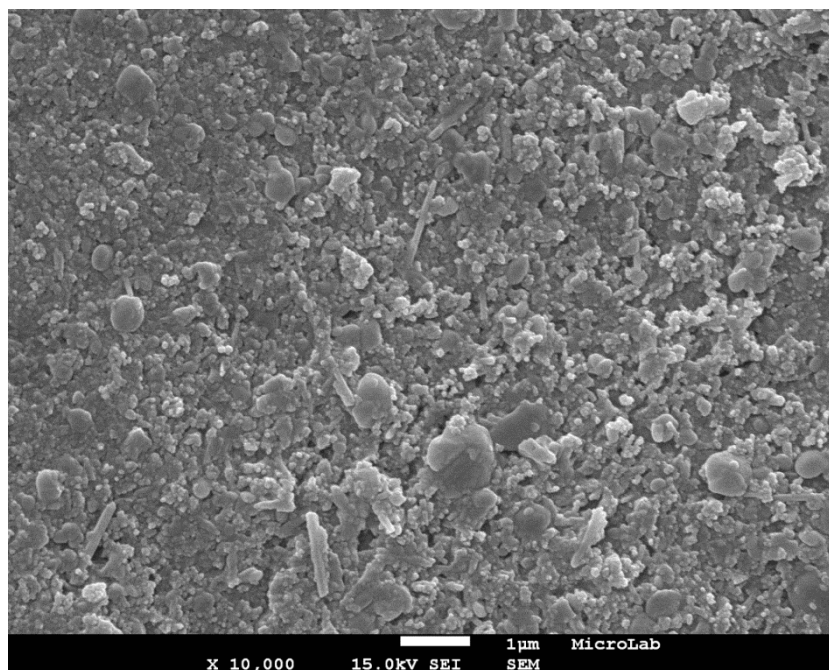


Figura 41. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x10000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um verniz de fluoreto de sódio e CFC, zonas homogêneas, compatíveis com remineralização, formando fluoreto de cálcio.



Figura 42. Visão panorâmica sobre a superfície do esmalte a x30000, após a indução de lesões de *white spot*, tratamento com um verniz de fluoreto de sódio e CFC, onde se observam várias zonas de precipitado de fluoreto de cálcio e reorganização desta camada superficial.

Quando submetidos ao CFC, o agente remineralizante que revelou valores médios mais elevados no aumento da microdureza de superfície foi o Grupo B (266,8 HV) apesar de apresentar valores bastante semelhantes ao Grupo C (261,8 HV). Contudo nas imagens qualitativas na observação ao MEV, encontramos imagens mais homogêneas de depósito mineral na superfície de esmalte, nos Grupos C e D, comparativamente aos Grupos A e B.

1. RESUMO DOS VALORES OBTIDOS NA ANÁLISE DE MICRODUREZA DE VICKERS EM CADA FASE DO ESTUDO

Tabela 11. Tabela comparativa dos resultados de microdureza de superfície obtidos em cada grupo e em cada fase do estudo.

Grupos/Fase do estudo	Grupo A: controle positivo	Grupo B: gel de CPP-ACP	Grupo C: verniz de fosfato de cálcio	Grupo D: verniz de fluoreto de sódio
Fase 1: LAWS	93,00 HV			
Fase 1: tratamento AR	56,7 HV	290 HV	136 HV	224 HV
Fase 2	116,7 HV	266,8 HV	261,8 HV	158,8 HV

2. RESUMO DAS IMAGENS OBTIDAS EM MEV EM CADA FASE DO ESTUDO:

Tabela 12. Imagens obtidas após indução de LAWS (Fase 1) (x1000; x10000; x30000).

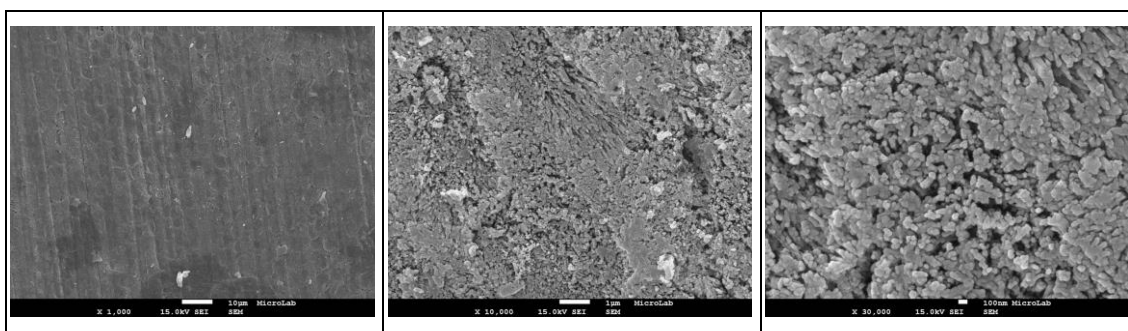


Tabela 13. Imagens obtidas após indução de LAWS, aleatorização dos grupos e tratamento com um agente remineralizante.

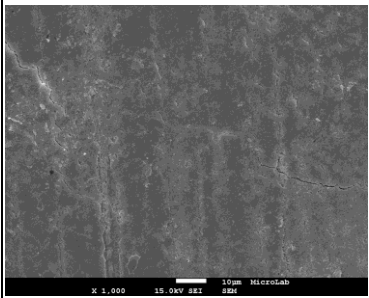
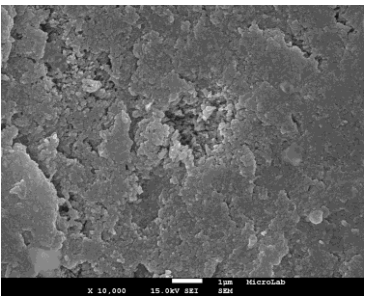
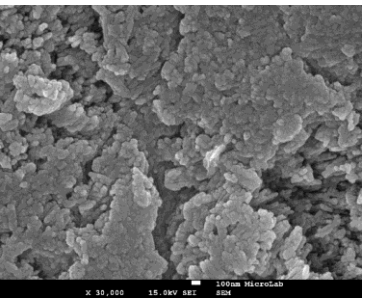
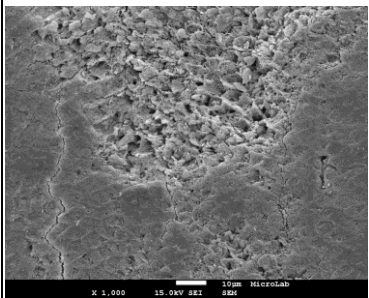
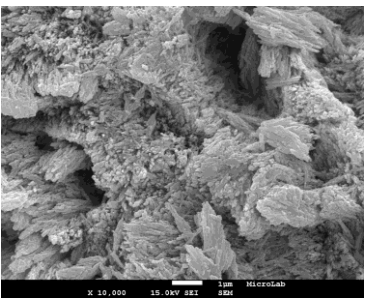
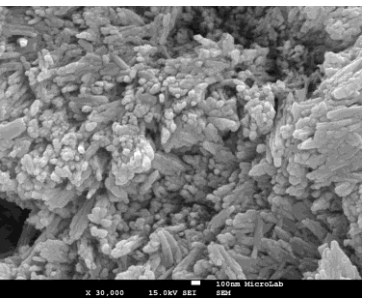
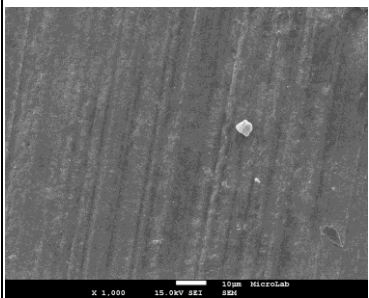
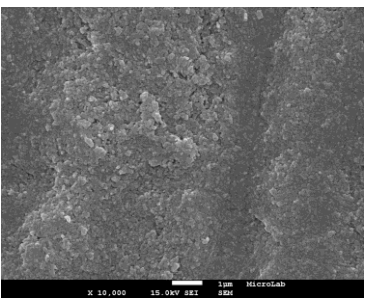
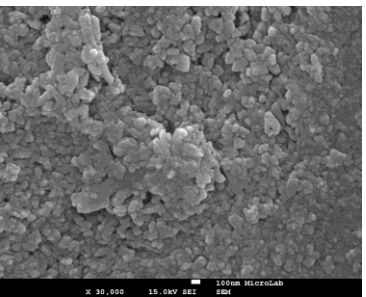
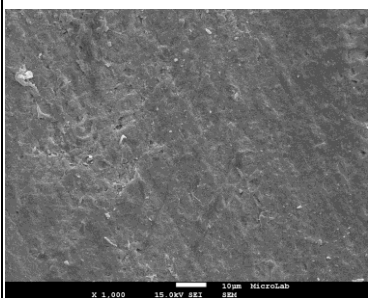
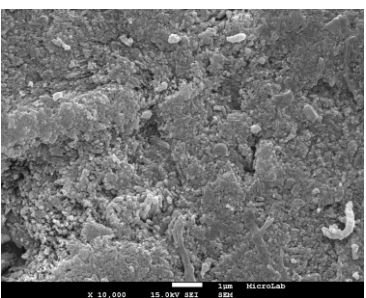
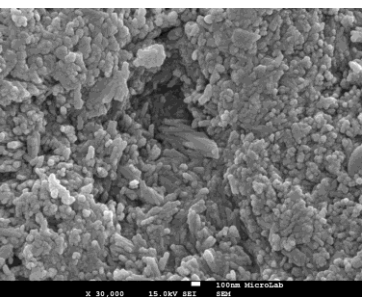
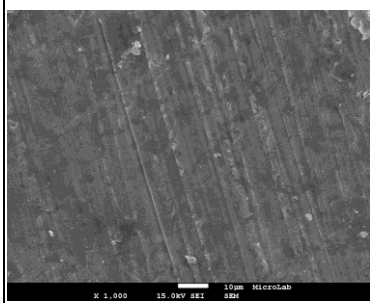
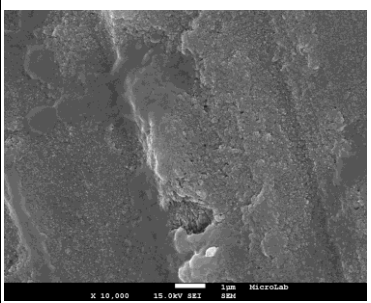
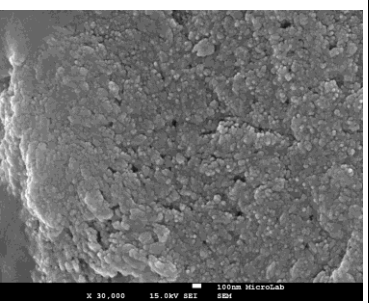
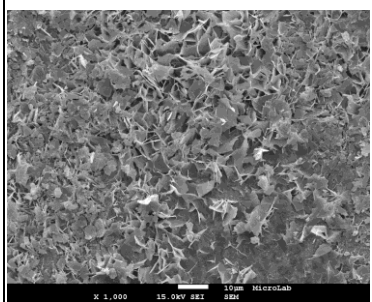
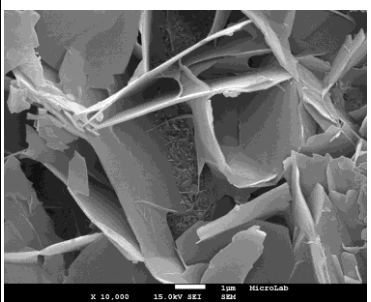

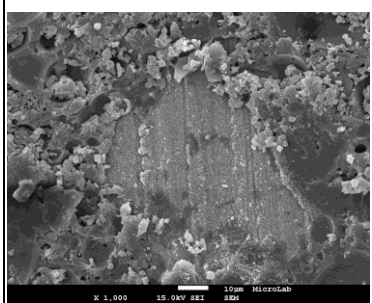
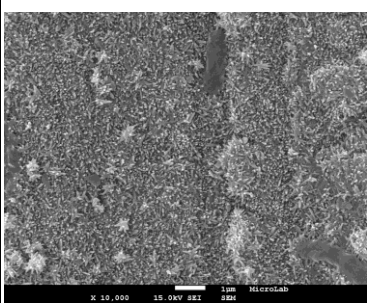
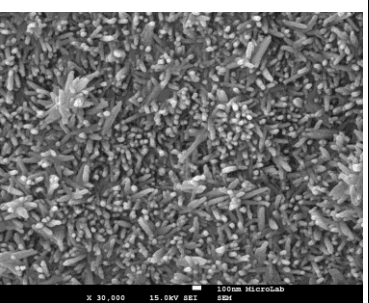
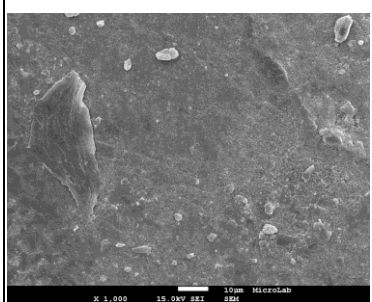
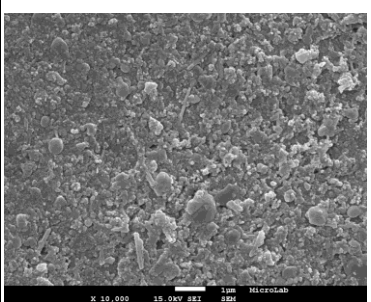
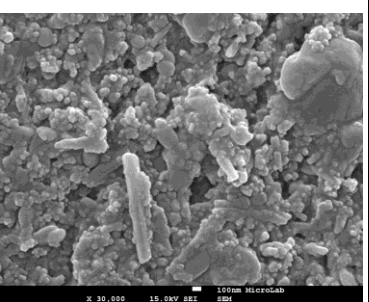
Grupo A (x1000; x10000; x30000) – controle positivo		
		
Grupo B (x1000; x10000; x30000)		
		
Grupo C (x1000; x10000; x30000)		
		
Grupo D (x1000; x10000; x30000)		
		

Tabela 14. Imagens obtidas após indução de LAWS, tratamento com um agente remineralizante e CFC.

Grupo A (x1000; x10000; x30000) – controle positivo		
		
Grupo B (x1000; x10000; x30000)		
		
Grupo C (x1000; x10000; x30000)		
		
Grupo D (x1000; x10000; x30000)		
		

IV - DISCUSSÃO

No desenvolvimento deste estudo foram usados 3 agentes remineralizantes (CPP-ACP, fosfato de cálcio e fluoreto de sódio) que, de acordo com vários autores, se demonstraram eficazes na remineralização de lesões de *white spot*, (Mehta, Kumari, Jose, & Izadikhah, 2014; Sh et al., 2013), com o intuito destes poderem ser comparados quanto à sua eficácia. O efeito remineralizante dos vernizes de alta concentração de flúor é há muito conhecido, apesar de a sua eficácia estar dependente da disponibilidade de cálcio e fosfato presentes no meio (Peric et al., 2015). Assim, foram procurados novos produtos que, individualmente ou em conjunto com o flúor, apresentassem resultados igualmente satisfatórios e cuja atuação não fosse dependente dos iões cálcio e fosfato presentes na saliva, como é o caso do gel de CPP-ACP que, por si só, fornece os iões necessários à remineralização (Reynolds, 2009; Mehta et al., 2014; Peric et al., 2015). Para comparar estes agentes remineralizantes, foi analisada a microdureza de superfície e observados em MEV, os espécimes tratados com os diferentes agentes.

Nos testes de microdureza de superfície foi usada a técnica de microdureza de Vickers, uma vez que esta técnica permite o estudo de lesões mais profundas quando comparada por exemplo, com a técnica de microdureza de superfície de Knoop. De acordo com o estudo de Lippert & Lynch (2014), apoiado na técnica de microdureza de superfície de Knoop, após 48h de desmineralização, alguns espécimes apresentam uma profundidade de lesão acima de 40 μm . Atendendo a que a técnica de Knoop se apresenta mais eficaz na medição de lesões menores ou iguais a 40 μm , no presente trabalho optou-se por recorrer à técnica de Vickers, uma vez que permite a análise de lesões com profundidades menores ou iguais a 100 μm (Lippert & Lynch, 2014). Segundo Mehta, Kumari, Jose & Izadikhah (2014), a medição da microdureza de superfície é a técnica adequada ao estudo da desmineralização e remineralização do esmalte uma vez que este apresenta uma fina microestrutura, não homogênea e propensa a fraturas (Mehta et al., 2014).

Uma vez que se pretendia a observação detalhada da superfície do esmalte tratado, e a obtenção de imagens de elevada resolução, recorreu-se ao MEV (Levrini, Di Benedetto, & Raspanti, 2014; Rodríguez-Vilchis, Contreras-Bulnes, Olea-Mejía, Sánchez-Flores, & Centeno-Pedraza, 2011).

É da máxima importância que as lesões iniciais de cárie sejam tratadas com agentes remineralizantes, uma vez que a perda de substância mineral compromete a

estrutura dentária, levando à formação de uma cavitação irreversível (Aoba, 2004; Mehta et al., 2014). Assim, devem conhecer-se as vantagens e desvantagens de cada agente remineralizante, para que seja utilizado o que mais se adequa a cada situação, e que apresente maior eficácia.

Relativamente à análise de microdureza de Vickers, a média dos valores obtidos após a indução de LAWS foi de 93,99HV. Segundo o estudo de Taher, Alkhamis & Dowaidi (2012), a microdureza média observada em esmalte saudável está entre $290,6 \text{ HV} \pm 74,7$ e $382,6 \text{ HV} \pm 71,5$ (Taher, Alkhamis, & Dowaidi, 2012) e segundo Mehta *et al.* (2014) esta média é de 385.73 (Mehta et al., 2014), comprovando-se assim perda de substância mineral da superfície do esmalte, e a presença de *white spots*, que permitiram a análise da eficácia dos agentes remineralizantes.

O mesmo se pode constatar nas imagens obtidas no MEV, onde se observa desorganização estrutural do esmalte, tanto dos prismas como da substância interprismática, com planos de destruição heterogêneos e aspeto lacunar.

Após a aleatorização dos grupos, cada um dos espécimes foi tratado com o agente remineralizante referente ao grupo a que pertencia. Através da manutenção de um grupo de controlo positivo (grupo A), foi possível analisar a microdureza do esmalte não tratado (56,7 HV), em comparação com os restantes grupos.

Nesta fase, o agente que se mostrou mais eficaz no aumento da microdureza de superfície do esmalte, sem influência da saliva, foi o gel de CPP-ACP (290 HV). Este resultado poderá dever-se ao facto de este agente possuir na sua constituição fosfato de cálcio amorfo, estabilizado e mantido em altas concentrações pelo fosfopéptido caseína, disponibilizando à superfície dentária o cálcio e fosfato necessários à remineralização da sua estrutura (F. G. De Carvalho et al., 2013; Li et al., 2014; Peric et al., 2015)

No entanto, quando observados ao MEV, os espécimes que apresentam melhores resultados são os dos grupos C e D, uma vez que apresentam superfícies com complexos minerais mais homogêneos, havendo mesmo preenchimento de espaços lacunares, no caso do verniz de fosfato de cálcio, e deposição mineral e de substância interprismática no caso do verniz de fluoreto de sódio, contrastantes com a heterogeneidade e desorganização dos prismas de esmalte do espécime tratado com gel de CPP-ACP. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Carvalho *et al.* (2013) que, apesar de no seu estudo ter usado o método AFM (Atomic Force

Microscopy), após a aplicação de CPP-ACP também observou uma camada protetora do esmalte, com depósitos minerais não homogêneos e irregulares. O mesmo foi observado por Poggio, Lombardini, Dagna, Chiesa & Bianchi (2009), apesar deste, contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, defender a formação de uma camada que preenche as cavidades interprismáticas e cobre parcialmente os prismas de esmalte (Poggio, Lombardini, Dagna, Chiesa, & Bianchi, 2009).

Na última fase do estudo, e após a submissão de todos os espécimes a um ciclo de pH, observou-se um aumento da microdureza de superfície em todos os grupos. Através da análise do espécime do grupo A (116,7 HV), observa-se que, por si só, a saliva artificial permite uma maior remineralização, do que a desmineralização provocada pelo ácido láctico, permitindo a recuperação de parte da estrutura mineral perdida. Isto deve-se ao facto de, na sua constituição, a saliva artificial possuir iões como cálcio e fosfato, indispensáveis à remineralização do esmalte, e que são parte integrante dos cristais de hidroxiapatite (Sh et al., 2013).

Quando observado ao MEV, o espécime do grupo A apresenta algumas zonas de reorganização mineral. No entanto, a saliva artificial não é suficiente para reverter a desmineralização que se mantém visível noutras zonas.

Nesta fase, o agente remineralizante que se mostrou mais eficaz no aumento da microdureza de superfície foi novamente o gel de CPP-ACP (266,8 HV), apesar de apresentar valores bastante semelhantes ao grupo C – fosfato de cálcio (261,8 HV). Este aumento da microdureza de superfície deve-se ao facto de, como referido anteriormente, o gel de CPP-ACP possuir na sua constituição a caseína, que tem a capacidade de estabilizar o fosfato de cálcio amorfo presente no gel, e os iões cálcio e fosfato em suspensão na saliva artificial, havendo assim uma supersaturação dos iões cálcio e fosfato necessários à remineralização do esmalte (Rose, 2000; Poggio et al., 2009; Poggio, Lombardini, Colombo, & Bianchi, 2010; Carvalho et al., 2013; Mettu, Srinivas, Sampath, & Srinivas, 2015). Os valores de microdureza de superfície do espécime tratado com fosfato de cálcio são também bastante elevados uma vez que este verniz possui também, na sua constituição, fluoreto de sódio, que é estabilizado pelo fosfato de cálcio mantendo-se estes dois compostos em altas concentrações. Quando em conjunto com a saliva artificial, constituída por iões cálcio e fosfato, existe uma supersaturação destes constituintes, com formação de fluoreto de cálcio, promovendo a remineralização

por formação de hidroxiapatite e de fluorapatite, devido a presença de flúor (F. G. De Carvalho et al., 2013; Sh et al., 2013).

Relativamente à observação em MEV, continua a haver uma maior homogeneidade nas imagens obtidas nos grupos C e D, quando comparadas aos grupos A e B, havendo mesmo uma reorganização da camada superficial em ambos os grupos. Apesar de aumentar a microdureza de superfície, o gel de CPP-ACP não tem capacidade de reverter a destruição da estrutura cristalina, apresentando várias lacunas no complexo de hidroxiapatite e depleção de fosfato de cálcio, em concordância com os resultados obtidos na análise em MEV efetuada por Mehta et al. (2014), que refere a existência de depósitos minerais na superfície do esmalte, após a aplicação do gel de CPP-ACP, apesar destes serem pequenos e amorfos (Mehta et al., 2014). Este resultado poderá dever-se ao facto de os vernizes que contêm fluoreto de sódio apresentarem uma elevada adesão à superfície dentária e terem uma elevada concentração de flúor, que promove a formação de fluoreto de cálcio e que, por sua vez, funcionam como reservatórios de flúor (F. G. De Carvalho et al., 2013).

Neste estudo, a principal limitação encontrada prende-se com o número reduzido de espécimenes integrantes da amostra. Futuramente, poderia ser-lhe dada continuidade com uma amostra mais alargada e introduzindo um novo agente remineralizante: o CPP-ACFP. Neste agente, ao fosfato de cálcio amorfo já existente, foi adicionado o ião fluoreto (Peric et al., 2015).

V - CONCLUSÃO

Existem alterações qualitativas na superfície do esmalte humano, quando se empregam vernizes de flúor de alta concentração, após a indução artificial de cárie dentária, quando comparadas com a superfície de esmalte humano, remineralizado com o sistema CPP-ACP, sendo que em todas as fases do estudo, os vernizes de flúor de alta concentração tendencialmente modificam a qualidade da superfície do esmalte humano, após a indução artificial de cárie dentária.

Existe ainda uma diferença significativa na microdureza do esmalte humano, quando se utilizam vernizes de flúor de alta concentração, após a indução artificial de cárie dentária. No entanto, existe também diferença na microdureza de superfície do esmalte humano quando se comparam sistemas de verniz de flúor de alta concentração com sistemas de CPP-ACP, sendo que este último expressa uma tendência ao aumento da microdureza de superfície do esmalte humano, relativamente aos sistemas de verniz de flúor de alta concentração.

VI - BIBLIOGRAFIA

- Aoba, T. (2004). Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases*, 10(5), 249–57. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01030.x>
- Arends, J., & Christoffersen, J. (1986). The nature of early caries lesions in enamel. *Journal of Dental Research*, 65(1), 2–11. <http://doi.org/10.1177/00220345860650010201>
- Bowen, W. H. (2002). Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(2), 126–131.
- Buskes, J. A. K. M., Christoffersen, J., & Arends, J. (1985). Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions - A new technique with applications. *Caries Research*, 19, 490–496.
- Caneppele, T. M. F., Jeronymo, R. D. I., Di Nicoló, R., de Araújo, M. A. M., & Soares, L. E. S. (2012). In vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: Surface profile analysis and energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Brazilian Dental Journal*, 23, 373–378. <http://doi.org/10.1590/S0103-64402012000400011>
- Cao, Y., Mei, M. L., Xu, J., Lo, E. C. M., Li, Q., & Hung, C. (2013). Biomimetic mineralisation of phosphorylated dentine by CPP-ACP. *Journal of Dentistry*, 41(9), 818–825. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.06.008>
- Cardoso, C. a. B., de Castilho, a. R. F., Salomão, P. M. a., Costa, E. N., Magalhães, a. C., & Buzalaf, M. a. R. (2014). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42, 1495–1501. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.08.009>
- Carvalho, D., Salazar, M., Silva, E., & Coutinho, F. (2010). O uso de vernizes fluoretados e a redução da incidência de cárie dentária em pré-escolares : uma revisão sistemática Fluoride varnishes and decrease children : a systematic review. *Rev Bras Epidemiol*, 13(1), 139–149. <http://doi.org/10.1590/S1415-790X2010000100013>
- Carvalho, F. G. De, Brasil, V. L. M., Silva Filho, T. J. Da, Carlo, H. L., Santos, R. L. Dos, & Lima, B. A. S. G. De. (2013). Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Brazilian Oral Research*, 27(6), 463–70. <http://doi.org/10.1590/S1806-83242013000600004>
- Cochrane, N., Cai, F., Huq, N., MF, B., & Reynolds, E. (2010). New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *J Dent Res.*, 89(11), 1187–97.
- Costa, S. M., Martins, C. C., Bonfim, M. D. L. C., Zina, L. G., Paiva, S. M., Pordeus, I. a., & Abreu, M. H. N. G. (2012). A systematic review of socioeconomic indicators

- and dental caries in adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(10), 3540–3574. <http://doi.org/10.3390/ijerph9103540>
- Cummins, D. (2013). The development and validation of a new technology , based upon 1 . 5 % arginine , an insoluble calcium compound and fluoride , for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *Journal of Dentistry*, 41, S1–S11. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.04.002>
- De Carvalho, F. G., de Fucio, S. B. P., Sinhoreti, M. A. C., Correr-Sobrinho, L., & Puppim-Rontani, R. M. (2008). Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. *Brazilian Dental Journal*, 19, 139–144. <http://doi.org/10.1590/S0103-64402008000200010>
- Delbem, A. C. B., Bergamaschi, M., Sasaki, K. T., & Cunha, R. F. (2006). Effect of fluoridated varnish and silver diamine fluoride solution on enamel demineralization: pH-cycling study. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 14(2), 88–92. <http://doi.org/10.1590/S1678-77572006000200005>
- Do, D., Orrego, S., Majd, H., Ryou, H., Mutluay, M. M., Xu, H. H. K., & Arola, D. D. (2013). Accelerated fatigue of dentin with exposure to lactic acid. *Biomaterials*, 34(34), 8650–8659. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.090>
- Epasinghe, D. J., Yiu, C. K. Y., & Burrow, M. F. (2014). Synergistic effect of Proanthocyanidin and CPP-ACFP on remineralization of artificial root caries. *Australian Dental Journal*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/adj.12249>
- Fejerskov, O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Research*, 38(3), 182–191. <http://doi.org/10.1159/000077753>
- Griffin, S. O., Regnier, E., Griffin, P. M., & Huntley, V. (2007). Effectiveness of fluoride in preventing caries in adults. *Journal of Dental Research*, 86(5), 410–415. <http://doi.org/10.1177/154405910708600504>
- Heravi, F., Ahrari, F., Mahdavi, M., & Basafa, S. (2014). Comparative evaluation of the effect of Er : YAG laser and low level laser irradiation combined with CPP-ACPF cream on treatment of enamel caries. *J Clin Exp Dent.*, 6(2), 121–126. <http://doi.org/10.4317/jced.51309>
- Jayarajan, J., Janardhanam, P., & Jayakumar, P. (2011). Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization - an in vitro study using scanning electron microscope and DIAGNOdent. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*. <http://doi.org/10.4103/0970-9290.80001>
- Jo, S.-Y., Chong, H.-J., Lee, E.-H., Chang, N.-Y., Chae, J.-M., Cho, J.-H., ... Kang, K. hw. (2014). Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. *The Korean Journal of Orthodontics*, 113–118.

- Larsen, M. J., & Pearce, E. I. F. (2003). Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Archives of Oral Biology*, 9969(48), 317–322. [http://doi.org/10.1016/S0003-9969\(03\)00007-4](http://doi.org/10.1016/S0003-9969(03)00007-4)
- Lata, S., Varghese, N. O., & Varughese, J. M. (2010). Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*. <http://doi.org/10.4103/0972-0707.62634>
- Levrini, L., Di Benedetto, G., & Raspanti, M. (2014). Dental wear: a scanning electron microscope study. *BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2014/340425>
- Li, J., Xie, X., Wang, Y., Yin, W., Antoun, J. S., Farella, M., & Mei, L. (2014). Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *Journal of Dentistry*, 42(7), 769–777. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.015>
- Lippert, F., & Lynch, R. J. M. (2014). Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Archives of Oral Biology*, 59(7), 704–10. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.04.005>
- Magalhães, a. C., Comar, L. P., Rios, D., Delbem, a. C. B., & Buzalaf, M. a R. (2008). Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF4) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *Journal of Dentistry*, 36, 158–162. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.12.001>
- Mehta, A. B., Kumari, V., Jose, R., & Izadikhah, V. (2014). Remineralization potential of bioactive glass and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on initial carious lesion: An in-vitro pH-cycling study. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*. <http://doi.org/10.4103/0972-0707.124085>
- Menêses da Silva, R., Ferreira, J. M. S., Silva, C. D. B. da, Fontes, L. de B. C., Granville-Garcia, A. F., & Aparecida de Menezes, V. (2012). In vivo evaluation of therapeutic potential of fluoride varnishes. *Rev Odonto Cienc*, 27(3), 233–237.
- Mettu, S. M., Srinivas, N. S., Sampath, R. S., & Srinivas, N. (2015). Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (cpp-acp) on caries-like lesions in terms of time and nano-hardness: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 269–273.
- Mohanty, P. (2014). An in Vitro Evaluation of Remineralization Potential of Novamin ® on Artificial Enamel Sub-Surface Lesions Around Orthodontic Brackets Using Energy Dispersive X-Ray Analysis (E DX). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(11), 88–91. <http://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9340.5177>
- Mony, S., Rao, A., Shenoy, R., & Suprabha Srikrishna, B. (2015). Comparative evaluation of the remineralizing efficacy of calcium sodium phosphosilicate agent

- and fluoride based on quantitative and qualitative analysis. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 33(4), 291–295.
- Oliveira, G. (2009). *Comparison among CPP-ACP, Fluoride and a combination of CPP-ACP / Fluoride and their ability to remineralize White Spot lesions in vitro*.
- Oliveira, G. M. S., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42, 1592–1602. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.004>
- Peric, T., Markovic, D., Petrovic, B., Radojevic, V., Todorovic, T., Radicevic, B. A., ... Spiric, V. T. (2015). Efficacy of pastes containing CPP-ACP and CPP-ACFP in patients with Sjögren's syndrome. *Clinical Oral Investigations*. <http://doi.org/10.1007/s00784-015-1444-1>
- Poggio, C., Lombardini, M., Colombo, M., & Bianchi, S. (2010). Impact of two toothpastes on repairing enamel erosion produced by a soft drink: An AFM in vitro study. *Journal of Dentistry*, 38(11), 868–874. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.07.010>
- Poggio, C., Lombardini, M., Dagna, A., Chiesa, M., & Bianchi, S. (2009). Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM in vitro study. *Journal of Dentistry*. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.07.011>
- Queiroz, C. S., Hara, A. T., Paes Leme, A. F., & Cury, J. A. (2008). pH-Cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel De- and remineralization. *Brazilian Dental Journal*, 19, 21–27. <http://doi.org/10.1590/S0103-64402008000100004>
- Reynolds, E. C. (2009). Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate: The Scientific Evidence. *Advances in Dental Research*, 21(1), 25–29. <http://doi.org/10.1177/0895937409335619>
- Rodríguez-Vilchis, L. E., Contreras-Bulnes, R., Olea-Mejía, O. F., Sánchez-Flores, I., & Centeno-Pedraza, C. (2011). Morphological and Structural Changes on Human Dental Enamel After Er:YAG Laser Irradiation: AFM, SEM, and EDS Evaluation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29(7), 493–500. <http://doi.org/10.1089/pho.2010.2925>
- Rose, R. K. (2000). Binding characteristics of Streptococcus mutans for calcium and casein phosphopeptide. *Caries Research*, 34, 427–431. <http://doi.org/10.1177/00220166000340040010>
- Rošin-Grget, K., Peroš, K., Sutej, I., & Bašić, K. (2013). The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Academica*, 42(2), 179–88. <http://doi.org/10.5644/ama2006-124.85>
- Sh, P., Raghu, R., Shetty, A., Gautham, P., Reddy, S., & Srinivasan, R. (2013). Effect of organic versus inorganic fluoride on enamel microhardness: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*. <http://doi.org/10.4103/0972-0707.111314>

- Shetty, S., Hegde, M. N., & Bopanna, T. P. (2014). Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*. <http://doi.org/10.4103/0972-0707.124136>
- Taher, N. M., Alkhamis, H. A., & Dowaidi, S. M. (2012). The influence of resin infiltration system on enamel microhardness and surface roughness: An in vitro study. *The Saudi Dental Journal*, 24(2), 79–84. <http://doi.org/10.1016/j.sdentj.2011.10.003>
- Urban, V. M., Machado, A. L., Vergani, C. E., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C., de Almeida, F. G., & Cass, Q. B. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dental Materials*, 25(5), 662–671. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.10.017>